

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**PRODUCCIÓN DE POLISACÁRIDOS POR CÉLULAS
INMOVILIZADAS DE PSEUDEVERNIA FURFURACEA (L.)
ZOPF**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Teresa Pereyra de la Iglesia

Bajo la dirección del doctor

Carlos Vicente Córdoba

Madrid, 2000

ISBN: 84-669-2420-5

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I



POLISACÁRIDOS DE LÍQUENES: APLICACIÓN EN
SISTEMÁTICA Y VARIACIONES ESTACIONALES

M^a TERESA PEREYRA DE LA IGLESIA

MADRID, 2000

24794

T 24794

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I



POLISACÁRIDOS DE LÍQUENES: APLICACIÓN EN
SISTEMÁTICA Y VARIACIONES ESTACIONALES.

Memoria presentada por M^a Teresa Pereyra de la Iglesia, licenciada con grado
en Biología, para optar al grado de doctor por la Universidad Complutense de
Madrid.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "T. Pereyra".

Fdo. M^a Teresa Pereyra de la Iglesia

V^o B^o de los Directores

A handwritten signature in black ink, appearing to be "C. Córdoba".

Carlos Vicente Córdoba

A handwritten signature in black ink, appearing to be "J. Antonio Leal Ojeda".

J. Antonio Leal Ojeda

BIBLIOTECA



Esta Tesis ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C. y la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

Han sido numerosas las personas que me han ayudado y desearía expresar mi profundo agradecimiento a todas.

Al Dr. Carlos Vicente, codirector de esta Tesis, por permitirme trabajar en un tema que bajo mi punto de vista resulta apasionante, por sus consejos y paciencia.

Al Dr. J. Antonio Leal, también codirector de esta Tesis, por haberme "acogido" en su laboratorio y sin cuya ayuda no se habría realizado esta Memoria. Por sus enseñanzas e ilusión que transmite en la realización del trabajo.

A la Dra. Alicia Prieto, por la realización de los diferentes espectros de masas y cromatogramas de la Tesis, por todas las cosas que he aprendido y por su apoyo inestimable.

Al Dr. Manuel Bernabé, por su colaboración realizando los espectros y estudios de RMN y su amistad (aunque al final nadie va a salvar a las ballenas). A el Dr. Carrascal por su ayuda en los análisis estadísticos. A los Dres. Ana Rosa Burgaz y Leopoldo Sancho, por la determinación de parte del material empleado en la Tesis. A la Dra García Mendoza por su amabilidad al poder utilizar su impresora. A los Dres del departamento, Estrella Legaz, Teresa Rodríguez, etc, por su apoyo y consejos.

A mis compañeros del CIB, Jeza, Myriam, Bea, Lolí, Macu, Begoña, Jesús, Javi y Oussama por su amistad, saber compartir y estar siempre dispuestos a echarme una mano.

A los compañeros y amigos del laboratorio de la facultad, Marí Carmen, María, Blanca, Manuel, por todo lo que hemos pasado juntos.

También quiero mencionar a mis amigos de la facultad, María, Inma, Rocío, Raquel, Cristina, Pilar, Lara, Carlos, Manolo, Miguel Angel, Juan Carlos, Juanjo, Pedro y Nacho (sí me dejó a alguien espero que me perdone). Por la amistad, los ratos alegres y recios que hemos pasado y espero que valoren como yo.

A mis amigos del colegio y del instituto, Ana, Sofia, Esther, Patricia, Isabel, Carmen, Carlos..., por su cariño y apoyo.

A mis padres, abuela, hermana, mis tías, en fin, mi familia, por estar siempre ahí cuando se les necesita. Ya sabéis lo que os quiero.

A Ricardo, por muchas razones, pero la principal es lo que une nuestra vida compartida.

A mi abuela, a mi madre

A Ricardo

ÍNDICE	0
---------------	----------

INTRODUCCIÓN

1. LOS HONGOS LIQUENIZADOS Y SU METABOLISMO	6
1.1. Ecofisiología de los hongos liquenizados	9
2. LA PARED CELULAR: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	13
2.1. Pared celular del fotobionte	15
2.2. Pared celular del micobionte	16
2.3. Polisacáridos característicos de líquenes	18
2.4. Aplicaciones de los polisacáridos	23
3. FILOGENIA Y EVOLUCIÓN	24

OBJETIVOS	25
------------------	-----------

MATERIAL Y MÉTODOS

1. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL EMPLEADO	26
1.1. Familia Parmeliaceae	26
1.2. Familia Umbilicariaceae	26
1.3. Familia Cladoniaceae	26
2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS	26
2.1. Familia Parmeliaceae	28
2.2. Familia Umbilicariaceae	28
2.3. Familia Cladoniaceae	29
2.4. Precipitaciones con solución de Fehling y con propanol	29
2.5. Fraccionamiento en columna	30
2.6. Purificación de las fracciones insolubles A2I y F1I	31

2.7. Complejo glucano-quitina	31
3. ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS POLISACÁRIDOS	32
3.1. Valoración de la concentración de proteínas	32
3.2. Determinación de los ácidos urónicos	32
3.3. Reducción de los polisacáridos ácidos	32
3.4. Hidrólisis de los polisacáridos	33
3.5. Derivatización y análisis de los polisacáridos	33
3.5.1. Preparación de acetatos de alditol	33
3.5.2. Cromatografía gas-líquido	33
3.5.3. Metilación de los polisacáridos	34
3.5.4. Rotura reductora	35
3.5.5. Análisis de espectrometría de masas	36
3.6. Obtención del núcleo de manosa	37
3.7. Acetolisis del polisacárido	37
3.8. Oxidación con periodato y degradación de Smith	37
3.9. Determinación de N-acetilglucosamina	38
3.9.1. Hidrólisis de la quitina	38
3.9.2. Método colorimétrico	38
3.9.3. Identificación de glucosamina por HPLC	38
3.10. Análisis elemental del residuo	38
3.11. Determinación de grupos acetilos	39
4. MÉTODOS FÍSICOS DE ANÁLISIS DE LOS POLISACÁRIDOS	39
4.1. Espectroscopía de infrarrojo	39
4.2. Ionización/desorción por láser asistida por matriz-espectrometría de masas de tiempo de vuelo: MALDI-TOF	39
4.3. Resonancia magnética nuclear	40
5. ESTUDIO DE LAS VARIACIONES ESTACIONALES DE LAS FRACCIONES POLISACARÍDICAS.	40
5.1. Recogida del material	40

5.2. Extracción de los polisacáridos	41
5.3. Variables meteorológicas	43
5.4. Análisis estadístico	43
5.4.1. Correlaciones simples entre fracciones	43
5.4.2. Correlaciones simples entre fracciones y variables ambientales	43
5.4.3. Análisis de las componentes principales	43
5.4.4. Análisis de la varianza múltiple	44
5.4.5. Análisis de la varianza parciales	45
5.5. Estudio cualitativo estacional en la fracción F1S de <i>L. pustulata</i>	46

RESULTADOS

1.FAMILIA PARMELIACEAE

1.1. Resultados del fraccionamiento	47
1.2. Análisis preliminar de las fracciones extraídas con agua (A2 y A1)	47
1.3. Análisis preliminar de las fracciones extraídas con NaOH (F1)	48
1.4. Análisis de la fracción F2	49
1.5. Purificación de las fracciones solubles A2S y F1S	50
<u>2.5.1. Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones solubles A2S y F1S</u>	50
<u>2.5.2. Tratamiento con reactivo de Fehling. Determinación de monómeros</u>	51
<u>2.5.3. Cromatografía de exclusión molecular mediante FPLC en Sephacryl S-300 y análisis de las fracciones obtenidas</u>	52
<u>2.5.4. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex CL 6B</u>	55
<u>2.5.5. Precipitación con 2-propanol</u>	56
1.6. Metilación y análisis de las fracciones precipitadas con propanol	57
1.7. Obtención y análisis del esqueleto de manosa	58
1.8. Acetólisis de la fracción F1Sg(3) PP	59
1.9. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear	60

1.10. Oxidación con periodato y degradación de Smith de las fracciones insolubles en agua	62
1.11. Purificación y análisis de las fracciones insolubles en agua	63

2.FAMILIA UMBILICARIACEAE

2.1. Resultados del fraccionamiento	66
2.2. Análisis preliminar de las fracciones extraídas con agua (A2 y A1)	66
2.3. Análisis preliminar de las fracciones extraídas con NaOH (F1)	67
2.4. Análisis de la fracción F2	69
2.5. Purificación de las fracciones solubles A2S y F1S	71
<u>2.5.1. Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones solubles A2S y F1S</u>	71
<u>2.5.2. Tratamiento con reactivo de Fehling. Determinación de monómeros</u>	72
<u>2.5.3. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharose CL 6B</u>	75
<u>2.5.4. Precipitación con 2-propanol</u>	77
2.6. Metilación y análisis de las fracciones precipitadas con propanol	78
2.7. Obtención y análisis del esqueleto de las fracciones F1Sn	78
2.8. Acetólisis de la fracción F1Sn PP de <i>L. pustulata</i>	81
2.9. Espectroscopía de ^1H -RMN	82
2.10. Oxidación con periodato y degradación de Smith de las fracciones insolubles en agua	84
2.11. Purificación y análisis de las fracciones insolubles en agua (A2I y F1I)	85

3.FAMILIA CLADONIACEAE

3.1. Resultados del fraccionamiento	88
3.2. Análisis preliminar de las fracciones extraídas con agua (A2 y A1)	88
3.3. Análisis preliminar de las fracciones extraídas con NaOH (F1)	89

3.4. Análisis de la fracción F2	90
3.5. Purificación de la fracción solubles F1S	92
<u>3.5.1. Cromatografía de exclusión molecular de la fracción solubles F1S</u>	92
<u>Tratamiento con reactivo de Fehling.</u>	92
<u>3.5.2. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharose CL 6B</u>	93
<u>3.5.3. Precipitación con 2-propanol</u>	93
3.6. Metilación y análisis de las fracciones precipitadas con propanol	95
3.7. Espectroscopía de ^1H -RMN	97
3.8. Purificación y análisis de las fracciones insolubles en agua (A2I y F1I)	97
 4. VARIACIONES ESTACIONALES DE LAS FRACCIONES POLISACARÍDICAS	
4.1. Análisis estacional de los pesos de los polisacáridos de <i>P. furfuracea</i>	100
<u>4.1.1. Datos climáticos de las poblaciones estudiadas</u>	100
<u>4.1.2. Correlaciones simples entre fracciones y variables ambientales</u>	100
<u>4.1.3. Análisis de las Componentes Principales</u>	105
<u>4.1.4 Variación estacional y poblacional mediante análisis múltiple de la varianza (MANOVA)</u>	107
<u>4.1.5 Análisis de la varianza (ANOVA/ANCOVA) parciales</u>	108
4.2. Análisis estacional de los pesos de los polisacáridos de <i>L. pustulata</i>	113
<u>4.2.1. Datos climáticos de las poblaciones estudiadas</u>	113
<u>4.2.2. Correlaciones simples entre fracciones y variables ambientales</u>	113
<u>4.2.3. Análisis de las Componentes Principales</u>	116
<u>4.2.4 Variación estacional y poblacional mediante análisis múltiple de la varianza (MANOVA)</u>	118
<u>4.2.5 Análisis de la varianza (ANOVA/ANCOVA) parciales</u>	119
4.3. Estudio cualitativo estacional de la fracción F1S en <i>L. pustulata</i>	122
4.4. Pesos de las fracciones y datos meteorológicos	126

DISCUSIÓN

1. FRACCIONAMIENTO DE LOS POLISACÁRIDOS DEL TALO	135
1.1. Purificación y análisis de los polisacáridos aislados	136
2. FRACCIÓN EXTRAÍDA CON ÁLCALI Y SOLUBLE EN AGUA	141
3. ESTACIONALIDAD EN LAS FRACCIONES DE <i>P. FURFURACEA</i> Y <i>L. PUSTULATA</i>	150
3.1. Relaciones entre las fracciones y las variables ambientales	151
3.2. Análisis de la variación estacional mediante análisis de la varianza	155
<u>3.2.1. Variaciones estacionales de <i>P. furfuracea</i></u>	155
<u>3.2.2. Variaciones estacionales de <i>L. pustulata</i></u>	159
3.3. Variación cualitativa de la fracción F1S de <i>L. pustulata</i>	161
CONCLUSIONES	162
BIBLIOGRAFÍA	165

INTRODUCCIÓN

1. LOS HONGOS LIQUENIZADOS Y SU METABOLISMO

Los hongos han desarrollado diversas estrategias para la adquisición de compuestos carbonados. En el caso de los hongos liquenizados, dicha adquisición se realiza al establecer una relación de simbiosis mutualística con el alga o cianobacteria correspondiente. Por tanto pueden ser definidos como el resultado de la asociación de uno o más hongos o micobionte con una o más algas o fotobionte. Dicho fotobionte puede ser una cianobacteria (la más frecuente, *Nostoc*) denominándose entonces cianobionte, o un alga verde (*Trebouxia*, *Trentepohlia*) o ficobionte. El micobionte pertenece a los Ascomycetes (aunque también hay casos de Basidiomycetes y algún Deuteromycete). Esta estrategia ecológica le ha llevado a desarrollar una anatomía y morfología característica, donde el micobionte es el habitante más externo y en principio, también el responsable de la apariencia del talo, aunque un mismo micobionte pueda formar simbiosis con dos tipos de algas y tener una morfología externa distinta en cada caso. El fotobionte es el habitante más "interno", es decir, se encuentra en el interior del talo y es allí donde, si las condiciones ambientales son favorables, halla suficiente luz, temperatura, humedad y CO₂ para llevar a cabo una fotosíntesis neta positiva que permita un crecimiento del liquen (Büdel y Scheidegger, 1996).

Los hongos liquenizados son conocidos como pioneros o extremistas, es decir, son capaces de colonizar con éxito lugares que por sus características climáticas son poco accesibles a otros microorganismos o plantas. Esto en gran parte es posible gracias a esa simbiosis que le proporciona una relativa "autosuficiencia". Sin embargo, dependen en gran medida de su ambiente y por tanto su fisiología está muy relacionada con él. Los factores clave son los ya citados para el alga, pero una vez que se dan las condiciones adecuadas, se produce la síntesis de polioles o azúcares (según la especie de fotobionte: eritritol, ribitol, sorbitol, glucosa) que serán transferidos al micobionte (Figura 1). Aparentemente el hongo es capaz de estimular la secreción de polioles del alga, pero el mecanismo por el cual lo hace es todavía desconocido. Una vez

captados, los transformará en manitol u otros compuestos que mantengan sus actividades metabólicas (Lines *et al.*, 1989).

Además, el manitol, cuyo recambio o *turnover* es muy rápido, alcanza concentraciones relativamente altas intracelulares, y está implicado en otros aspectos de la biología como es el ser reserva o actuar como agente osmótico. También se ha observado que pueden actuar como metabolitos de estrés, sintetizados en condiciones de bajo contenido de agua (Honegger *et al.*, 1993) y así variar su concentración según la estación del año.

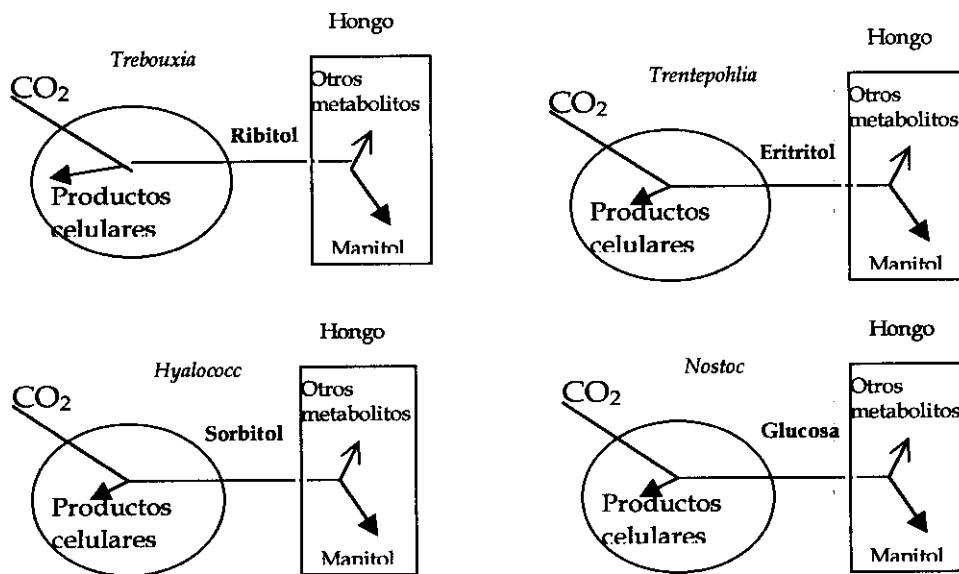


Figura 1. Técnica de inhibición mediante la cual, al suministrar al talo $^{14}CO_2$ y el carbohidrato correspondiente, podemos saber el tipo de compuesto que es transferido del fotobionte al micobionte. Modificado de Lines *et al.*, (1989).

Si tenemos en cuenta todos los aspectos de la fisiología ya citados en los que intervienen los polioles como factor clave, parece complicado llegar a conocer cómo todos los mecanismos están relacionados y se consigue un crecimiento conjunto de los biontes. De todas formas, existen modelos de metabolismo adaptados a los líquenes como el que ha sido descrito para *Hypogimnia physodes* (Figura 2). En él se puede observar un flujo de carbono característico donde la formación de materia estructural, el alto flujo respiratorio y la cantidad de poliol están relacionados (Farrar, 1988).

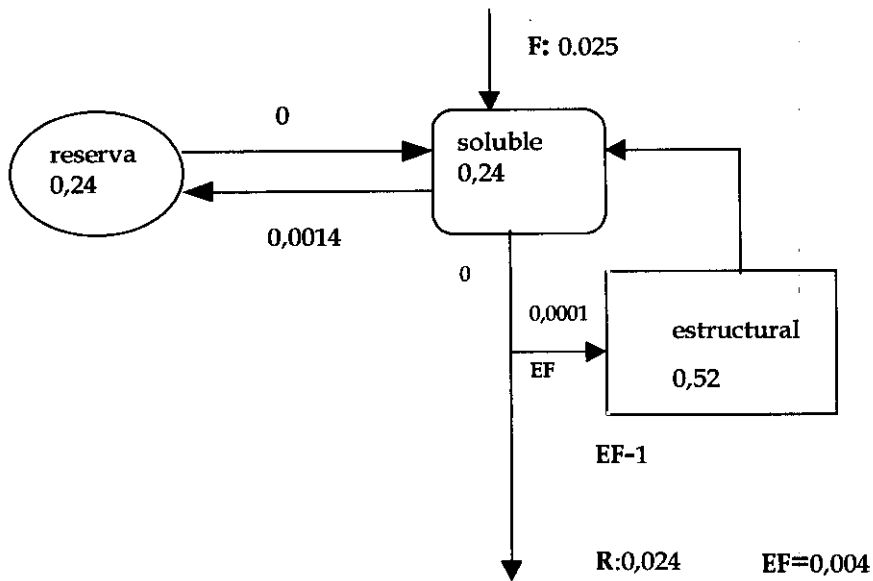


Figura 2. Modelo compartimental descrito para *Hypogymnia physodes*. Se consideran tres grupos de carbohidratos: *solubles*, *de reserva* y *estructurales*. El número de cada recuadro es la cantidad correspondiente en g/g peso seco. Las flechas representan el intercambio de carbohidratos entre los grupos, las unidades son g/g peso seco por día. F: fotosíntesis. R: respiración. EF: eficiencia en la conversión.

El hongo liquenizado es capaz de colonizar diferentes habitats. Poseen una peculiar adaptación a la desecación y a las temperaturas extremas, recuperando niveles normales de fotosíntesis después de un período adverso de humedad o temperatura. Los estudios realizados acerca de su fisiología demuestran la existencia de varios tipos de estrategias, como los mecanismos de protección intracelular (un ejemplo sería el manitol, que como hemos citado mantiene la turgencia) o la adaptación particular del liquen a su variable ambiente mediante, por ejemplo, cambios en la capacidad fotosintética (Kershaw, 1985). A este respecto también podemos añadir que los distintos fotobiontes siguen diferentes estrategias fotosintéticas. Así, el alga *Trebouxia* posee mecanismos de concentración del CO_2 que le permiten un incremento del mismo en el estroma dos o tres veces mayor que en el ambiente. Por otro lado, *Coccomyxa*, no tiene este mecanismo y su patrón fotosintético es más parecido al de una planta C_3 (Palmqvist *et al.*, 1994).

El crecimiento del talo parece estar directamente relacionado con el movimiento de carbohidratos del alga al hongo. Aunque es tridimensional, dicho crecimiento normalmente se expresa en mm/año y varía mucho según el ambiente y la morfología del hongo liquenizado. Generalizando, en climas templados los líquenes foliáceos crecen 0,5-4 mm/año, los fruticosos 1,5-5 mm/año y los crustosos 0,5-2 mm/año (Hale, 1973). Existen varios modelos funcionales de crecimiento basados en medidas fotosintéticas pero la proporción de fotosintatos que se emplean para el metabolismo, como hemos visto anteriormente, no muestra una relación proporcional simple. Un modelo alternativo propone la existencia de crecimiento local y dependiente de los patrones fotosintéticos con el tiempo (Lechowicz, 1983).

En hongos no liquenizados, se ha observado mediante el análisis de imágenes del ápice de la hifa, que su crecimiento no es del todo constante. López-Franco *et al.* (1994) demostraron en varias especies de hongos que en la elongación alternaban periodos de crecimiento rápido con crecimiento lento en intervalos más o menos regulares. Experimentos *in vitro* (Ray *et al.*, 1997) en hongos no liquenizados, indicaban que cuando la hifa está sometida a presión, el turgor (producido por la concentración de solutos citoplásmicos como los polioles) es la fuerza primaria que conduce a una extensión celular. Sin embargo estudios más recientes apuntan que no es el único mecanismo y relacionan más directamente el aumento de turgencia con los mecanismos de *crecimiento invasivo*. Esto explicaría cómo los hongos son capaces de penetrar rocas, degradar materiales biológicos, etc. (Money, 1999). Estudios recientes (Money, 1997) han demostrado que otros sistemas, como el citoesqueleto, juegan un papel importante en el crecimiento.

1.1. Ecofisiología de los hongos liquenizados

Como ya hemos mencionado, los líquenes son organismos poiquilohídricos que dependen del ambiente y por tanto su metabolismo está íntimamente relacionado con él. El clima de las regiones no ecuatoriales es variable pero en gran parte de las regiones existe un factor clave (simplificando quizás en

exceso) por el que se caracteriza la región. En zonas donde la temperatura es un elemento importante del clima, como las zonas de montaña o alpinas Sancho y Kappen (1989) demostraron que las diferentes especies de *Umbilicaria* estudiadas mostraban adaptaciones fotosintéticas particulares a su ambiente: las especies alpinas a temperaturas altas, revelaron un patrón de fotosíntesis neta inferior que el de las especies de montaña. Además, la tasa de respiración disminuía más bruscamente con la temperatura en las primeras que en las segundas. Los cambios de temperatura estacionales repercuten sin duda en estos organismos. Larson (1980) en una serie de experimentos, constató la existencia de cambios en el patrón fotosintético o respiración según la estación en la que recogían el material (verano e invierno), pero dichos cambios eran diferentes según la especie estudiada y no parecían mostrar procesos de aclimatación aunque otros procesos de adaptación sí que pudieran estar ocurriendo. Por ejemplo, en invierno *U. mammulata* decrecía la fotosíntesis neta mientras que la respiración aumentaba, como sucede en algunas plantas en proceso de endurecimiento al frío. En otros casos como el de *Peltigera canina*, (Kershaw, 1977) sí existieron cambios estacionales. Comparando dos especies de *Umbilicaria* con diferente distribución ecológica, Scott y Larson (1986) concluyeron que una de ellas, *U. vellea*, no podía colonizar lugares que permanecían algún tiempo cubiertos de nieve por su incapacidad para movilizar reservas en invierno (almidón y lípidos) al contrario que *U. deusta* que acumulaba dichas reservas para movilizarlas en dicha estación (aunque no decían cómo).

En líquenes fruticosos la temperatura también es un elemento importante pero además se han realizado estudios que muestran la existencia de otro "factor" determinante: la edad. Lechowicz (1983) puso de manifiesto la existencia de un claro patrón fotosintético dentro de las ramas de *Cladina stellaris* (también constatado por Nash *et al.*, 1980) en el que la fotosíntesis aumenta hasta los 5 años y va disminuyendo posteriormente. Por tanto, parece claro que el crecimiento y la producción son dependientes de los tejidos jóvenes, con mayor cantidad de fotobionte.

En líquenes con amplia distribución altitudinal, como *Pseudevernia furfuracea* se ha observado que la humedad óptima para la fotosíntesis neta aumenta al incrementar el hábitat altitudinal (citado en Kappen, 1988; pp 74). Otros patrones que parecen variar con este factor han sido los proteicos. Strobol y colaboradores (1994) estudiando esta misma especie, encontraron entre otras variaciones, una banda de 66 kDa en electroforesis realizadas con extractos de líquenes recolectados por debajo de los 1000 m que no se expresaba en líquenes recolectados a mayor altitud.

Existe un factor clave que es la disponibilidad de agua. Rikkinen (1997) describió el comportamiento de ésta cuando se rehidrataban diferentes talos recogidos a lo largo de una pendiente de una caldera en Finlandia. Observó que su conducción estaba parcialmente controlada por modificaciones higroscópicas en las dimensiones de los canales capilares. Así demostró la existencia de cambios en la estructura del talo de *P. furfuracea* vinculados con el gradiente topográfico de su distribución, poniendo de manifiesto la existencia de una relación entre dichos cambios y los regímenes de evaporación de agua tan cruciales en los niveles de actividad fotosintética.

En las especies foliáceas de la familia Umbilicariaceae este factor también parece estar íntimamente relacionado con la morfología interna y externa del talo (Sancho y Kappen, 1989). En este aspecto creo que hay que diferenciar los mecanismos de absorción-retención de agua y los de tolerancia al estrés hídrico puesto que actualmente estos últimos parecen más relacionados con las capacidades fisiológicas individuales de los biontes que con la morfología (Honegger *et al.*, 1996).

De los Ríos *et al.* (1999) demostraron la influencia de la radiación en la anatomía del liquen *L. hispanica*. Estudiando esta especie en dos habitat diferentes, un bosque y una cresta rocosa expuesta, se apreciaron cambios en varios parámetros medidos. En los talos de cresta se observó una capa de células blanquecina y un mayor empaquetamiento de la capa algal. Por el contrario, el contenido en clorofilas fue mayor en los talos de bosque.

Armstrong (1974) describió que el crecimiento de varias especies foliáceas se realizaba de forma discontinua en dos o más periodos del año. Además puntualizó que establecer la tasa de crecimiento sobre la base de un crecimiento radial no es lo ideal puesto que se observó una gran variabilidad del mismo en talos del mismo tamaño. Cambios en el grosor del talo o en el incremento del área con la edad contribuyen de manera importante al incremento de materia seca del talo. Otras observaciones de líquenes foliáceos demuestran un crecimiento desde el centro como las realizadas para la especie *Lasallia pustulata* (Hestmark, 1997) en las que durante 4 años se siguió la trayectoria de las características pústulas del talo. Los experimentos de Larson (1983), por el contrario, apoyan la idea de un patrón de crecimiento difuso, basándose en medidas de fotosíntesis neta.

En experimentos de campo y laboratorio con *L. pustulata* y *U. spodochoea*, Kappen *et al.* (1996) demostraron que en condiciones invernales la luz es el factor limitante, ya que la eficiencia fotosintética se mantenía aún a temperaturas bajas. Durante todo el periodo experimental (6 semanas), el agua se mantuvo en proporción superóptima, excepto en el día 8 de enero que bajó a subóptima. Sin embargo, quedan algunas preguntas que resultan difíciles de contestar. Por ejemplo, si la fotosíntesis en esas condiciones proporciona un incremento de masa o forma crioprotectores, etc. La tasa respiratoria, que también es una medida de crecimiento, es muy baja a temperaturas bajo 0°C.

En otro tipo de ambiente menos extremo Sundberg y Palmqvist (1997) llevaron a cabo experimentos de transplantes de dos especies: *Platismatia glauca* y *Lobaria pulmonaria*, a dos zonas diferentes, una zona abierta de borde de bosque y el interior de un bosque maduro de *Picea abies*. Con datos de microclima y fisiología de campo y laboratorio se intentó modelizar la ganancia de carbono. Sin embargo el peso seco de *L. pulmonaria* fue sobrestimado en la localidad abierta y para *P. glauca* fue subestimado en el interior del bosque maduro. En el primer caso pudo ser debido a un descenso detectado en el nivel de clorofilas además de un incremento en la tasa de ciclos humedad-sequedad en el talo. En el segundo caso, quizá se debió a una sobrestimación de la

respiración. Sin embargo estos datos soportan el hecho que la lenta tasa de crecimiento es principalmente debida a la escasez de ocasiones con actividad metabólica más que a una baja conversión de eficiencia fotosintética en dichos períodos activos.

2. LA PARED CELULAR: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

La pared celular permite al organismo desarrollar su propio estilo de vida (Bartnicki-García, 1984) e incluso, si nos referimos a los cinco reinos establecidos por Margulis (1981), podemos establecer una relación directa entre la pared celular y la estrategia trófica. Los casos a los que nuestro estudio se restringe serán los hongos (Ascomycetes) y las algas (Chlorophyta).

Los hongos están adaptados a la absorción y su pared celular, entre otras funciones, mantiene la presión interna, protege al hongo de las agresiones externas, confiere a la célula su morfología característica, etc. Estas propiedades están directamente relacionadas con su composición química y con su ultraestructura. En general, la pared está compuesta de glúcidos, proteínas, lípidos, pigmentos y sales minerales en orden decreciente de abundancia (Bartnicki-García, 1968). Los carbohidratos constituyen alrededor del 80% del peso seco de la pared y el monosacárido más abundante es la glucosa, seguido de galactosa, manosa y glucosamina (Gorin y Spencer, 1968). En menos proporción y en determinados grupos, se hallan galactosamina, ácido glucurónico, ramnosa y xilosa. Los menos representados en los distintos grupos taxonómicos son la arabinosa, fucosa y ribosa.

El análisis ultraestructural de la pared celular fúngica de *Schizophyllum commune* (Sietsma y Wessels, 1979a) muestra la existencia de dos capas: una interna formada por quitina (asociada a glucano) y otra más externa, soluble en álcali diluido, compuesta por homopolímeros, heteropolímeros y otros polisacáridos complejos. Todos estos polisacáridos de la pared se pueden separar de acuerdo con sus propiedades físicas y de esta forma hablaremos de polisacáridos estructurales cristalinos, insolubles en agua, y polisacáridos amorfos cementantes, solubles o no en agua fría o caliente. Resumiendo, los

tipos de polisacáridos que podemos encontrar en los hongos (no considerando ya los Phycomycetes) son los siguientes:

Quitina: Homopolímero lineal formado por moléculas de N-acetilglucosamina enlazadas en β -(1 \rightarrow 4). Su presencia en el hongo puede variar, según la especie, entre un 5% y un 60% de la pared celular. Los investigadores Sietsma y Wessels (1979b) demostraron que la quitina está asociada a un β -(1 \rightarrow 3) glucano y que en el enlace entre ambos polímeros participan algunos aminoácidos.

α -(1 \rightarrow 3) glucano: Puede representar entre el 15% y el 25% de los polisacáridos de la pared (Leal *et al.*, 1992). Contiene proporciones variables de enlaces α -(1 \rightarrow 4) y se encuentra en la superficie de la pared.

β -(1 \rightarrow 3) glucano: Se encuentra en la pared de todos los ascomicetos y basidiomicetos. Puede estar sustituido en la posición O-6 por un único residuo de glucosa o por cadenas laterales con enlaces β -(1 \rightarrow 6) o alternando β -(1 \rightarrow 6) y β -(1 \rightarrow 3) (Bacon *et al.*, 1969). Representa del 15% al 30% de la pared.

Otros polisacáridos: En algunos mixomicetos se han descrito polímeros de galactosamina como componentes principales de la pared (Farr *et al.*, 1977). Los zigomicetos poseen heteroglucuronanos, compuestos de ácido glucurónico, fucosa y manosa sobre todo (Bartnicki-García y Reyes, 1968).

Las levaduras poseen una pared celular diferente a la de otros grupos, caracterizándose por su gran cantidad de manoproteínas. La estructura de los mananos es de gran utilidad en la taxonomía de estos organismos (Sentandreu *et al.*, 1984). Además se han aislado heteropolisacáridos solubles en agua de diferentes hongos ascomicetos, a partir de fracciones obtenidas extrayendo paredes celulares con NaOH 1 M. Dichos polisacáridos son similares en todas las especies de un género mitospórico, que es homogéneo, y en las del correspondiente teleomorfo y se han propuesto como caracteres taxonómicos (Leal y Bernabé, 1998).

Respecto a la pared celular de las algas clorofíceas no liquenizadas se presenta como una estructura que varía según los géneros. En las Chlorococcales, se ha observado una estructura aparentemente trilaminar que

contiene esporopolenina (Atkinson *et al.*, 1972). En algunos casos, otro componente polisacárido es la **celulosa**. Es un β -(1→4) glucano que se encuentra organizado en microfibrillas y ha sido descrito en varios géneros en los que es una parte importante de la pared: *Valonia*, *Cladophora*, etc. (Percival y McDowell, 1981). A veces la glucosa aparece en combinación con galactosa (Northcote *et al.*, 1958) o xilosa (Cronshaw *et al.*, 1958). Otras Cloroficeas parecen estar desprovistas de celulosa y contienen **xilanos** y **mananos**. Los primeros poseen un enlace tipo β -(1→3) y forman estructuras microfibrilares. Respecto a los mananos, en general están descritos como β -(1→4) (Frei y Preston, 1968) aunque también hay un caso en el que el tipo de enlace es α -(1→3). (Bourne *et al.*, 1974).

Los polisacáridos mayoritarios en algunas algas verdes pluricelulares suelen ser complejos **heteropolisacáridos sulfatados**, solubles en agua y de peso molecular polidisperso. Por lo general se presentan unidos a proteínas y los monosacáridos constituyentes (arabinosa, galactosa, xilosa, ramnosa, glucosa e incluso ácido glucurónico) pueden variar entre los diferentes géneros e incluso con la época de recogida del material (Mackie y Percival, 1961). En muchas algas son difíciles de extraer y es necesario realizar un tratamiento alcalino. Parecen por tanto estar constituyendo la matriz de la pared formando un gel estabilizado por la presencia de iones. Otros polisacáridos que encontramos en estas algas sin estar formando parte de la pared celular son los que poseen función de reserva: almidón, inulina, etc.

2.1. Pared celular del fotobionte

La pared celular de los ficobiontes aislados presenta la estructura característica trilaminar típica de varios géneros de Chlorococcales. En particular, Honegger y Brunner (1981) propusieron dicho esquema (Figura 3) para los ficobiontes *Myrmecia* y *Coccomyxa*.

La pared celular de las algas liquenizadas difiere de las cultivadas aposimbíoticamente. En este segundo estado, se ha comprobado en algunos casos que presentan una pared celular mucho menos conspicua que en

simbiosis. Otras diferencias son que muestran tinción positiva con azul de Coomasie (proteínas), azul Alcian (polisacáridos ácidos), rojo de rutenio (polisacáridos ácidos), concanavalina A (residuos de glucosa o manosa) y autofluorescencia (Bubrick, 1988). Las propiedades inmunológicas se mostraron únicas para cada uno de los estados. Tanto en cultivo como en simbiosis es característica la presencia de almidón como material de reserva.

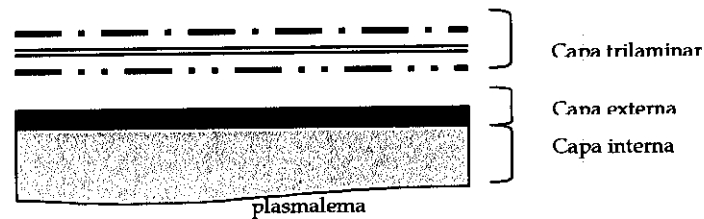


Figura 3. Esquema de la pared celular de *Myrmecia* y *Coccomyxa* (Modificado de Honegger y Brunner, 1981). Capa trilaminar: contiene partículas embebidas en una matriz de carbohidratos con una distribución aleatoria o no. En medio, una capa lisa contiene esporopolenina. La capa externa probablemente contiene fibras celulósicas embebidas en una matriz. La capa interna contiene heteropolisacáridos y tiene una estructura amorfa.

2.2. Pared celular del micobionte

El estudio de la pared de los hongos liquenizados es algo más complicado, por que su crecimiento en cultivo axénico es lento, además su aislamiento resulta complicado y no siempre es posible. Por otra parte, los trabajos que describen un polisacárido aislado de todo el líquen, no describen los componentes restantes, por lo que no se puede conocer la abundancia de éste en la pared.

La morfología externa del líquen es muy variable. Dependiendo de las especies podemos diferenciar talos crustáceos, foliáceos, fruticosos, etc. Esto se ve reflejado también en la morfología interna de las capas del talo y está directamente relacionado con la composición polisacarídica particular.

Centrándonos en el micobionte, uno de los pocos trabajos en que se define la estructura de la pared fue el de Boissière, de 1987. Propuso un modelo de pared celular para el micobionte de *Peltigera canina* y *Lassallia pustulata* en el que mediante extracciones diferenciales del talo líquénico, reconstruía la disposición de los polímeros en la pared (Figura 4).

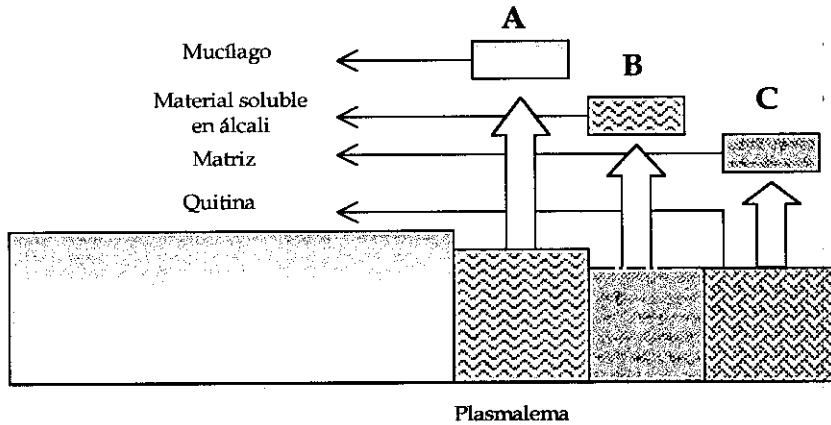


Figura 4. Esquema de distribución de los polisacáridos de *Peltigera canina* y *Lassallia pustulata* en la pared celular propuesto por Boissière (1987). A: extracción del talo con agua hirviendo. B: extracción con álcali diluido. C: extracción con ácido hirviendo. Los mucílago y el material soluble en álcali están compuestos de galactomananos y β -(1 \rightarrow 3) glucanos además de proteínas y glucosamina en *Peltigera*. La matriz es un β -(1 \rightarrow 6) y β -(1 \rightarrow 3) glucano.

Experimentos realizados con micobiontes aislados (Galun *et al.*, 1976) demostraron que eran capaces de incorporar N-(3 H)-acetilglucosamina a la pared y por tanto que la quitina es un componente esencial de la misma. Estudios posteriores de Honegger y Bartnicki-García (1991) demostraron que la pared celular de los micobiontes en cultivo axénico era similar a la de los demás Euascomycetes y que contiene un glucano mayoritario (probablemente un β -(1 \rightarrow 3)- β -(1 \rightarrow 6)) insoluble en álcali. Otros heteropolisacáridos solubles (7-10%) y la quitina (3-7%) constituían una fracción minoritaria. Además, contenían lípidos (10-3%) y proteínas (8-4%). La estructura de la pared de la hifa al microscopio electrónico de transmisión se reveló muy distinta a la que se observa en simbiosis ya que en las hifas de los cultivos sumergidos desaparecía una capa irregularmente teselada característica del micobionte en simbiosis.

También es diferente la morfología de la hifa en cultivo, puesto que se observaron células globosas y de pigmentación oscura que no aparecen en estado simbiótico.

Takahashi *et al.* (1979) estudiaron los polisacáridos de micobiontes y fotobiontes aislados de varias especies del género *Cladonia*, *Parmelia caperata* y *Ramalina crassa* concluyendo que básicamente el micobionte era el responsable de producir los polisacáridos característicos del liquen puesto que éstos se podían detectar en el cultivo aposimbiótico mientras que el alga podía sintetizar otros que no se hallaban en simbiosis. Sin embargo, existen otros polisacáridos producidos por el talo que por el momento no han podido aislarse de cultivos aposimbióticos del micobionte o fotobionte, como es el caso del liquenano o isoliquenano. Por tanto, y ya que la literatura de este tipo de experimentos es escasa, nos centraremos en un resumen de los polisacáridos aislados de talo.

2.3. Polisacáridos característicos de líquenes

Liquenano: es un glucano que fue primeramente aislado de *Cetraria islandica* mediante extracción con agua caliente y precipitación con agua fría por Berzelius (1815). Su estructura ha sido frecuentemente revisada y en la actualidad los estudios de Gorshkova *et al.* (1997) la consideran como:



Ha sido encontrado en numerosas especies de la familia Parmeliaceae y aunque la proporción de los diferentes residuos (1→3) y (1→4) varían, Common (1991) propone la existencia de este glucano como marcador taxonómico diferenciando dos tipos: uno del tipo *Cetraria* y otro tipo *Xanthoparmelia*.

Isoliquenano: es un glucano difícil de purificar puesto que es soluble en agua fría, como los galactomananos y suele mezclarse con ellos. La estructura general (Yokota *et al.*, 1979) sería la siguiente:



Aunque Gorin *et al.* (1988) apuntan que es necesaria una estandarización de la metodología para establecer bien, en todas las especies estudiadas, las

proporciones de los enlaces. También es considerada por Common (1991) como marcador taxonómico al estar presente en la familia Parmeliaceae.

Otros glucanos con enlaces (1→3) y (1→4): En general son polisacáridos cuyo porcentaje en el talo es pequeño, variando desde el 0,5 al 15%:

α-D-Glucanos: Existen varios trabajos en los que, por distintos métodos se aíslan α-D-glucanos con los enlaces citados. Por ejemplo, Nishikawa *et al.* (1974), estudiando 4 especies de *Cladonia* aislaron un polisacárido similar al nigerano con una razón de enlaces 53:47. En *Parmelia caperata* la razón de enlaces (1→3) y (1→4) dada por Takeda *et al.* (1970) fue de 1:1. En *Ramalina usnea* Gorin y Iacomini (1984) lograron aislar un glucano del sobrenadante de una precipitación con solución de Fehling con una razón de enlaces 76:24. De especies del género *Stereocaulon* se aisló al menos un glucano (1→3) y (1→4) con una proporción de dichos residuos de 3:1, parcialmente ramificado en las posiciones 3,4 ó 2,3 (Takahashi *et al.*, 1981).

β-D-Glucanos: En 1972, Takeda y sus colaboradores lograron aislar de *Evernia prunastri* un β-D-glucano que, con una proporción de residuos (1→3) y (1→4) de 3:1, se diferenciaba del liquenano por su solubilidad en agua fría. Los glucanos extraídos de especies del género *Usnea* son controvertidos. En algunos casos los análisis de GLC-MS junto con degradación de Smith revelan una razón 1:3 para los enlaces (1→3) y (1→4). En otros, como el que es comercializado por Sigma, el glucano aislado es de tipo liquenano.

β-D-Glucanos con enlaces (1→6): este tipo de glucano, denominado también pustulano, se encuentra en gran cantidad sobre todo en la familia Umbilicariaceae, aunque también se ha detectado (si bien en poca proporción) en otras especies no relacionadas con esta familia. Es soluble en agua caliente y precipita al enfriarse. Es lineal y está descrito que se encuentra acetilado en proporciones variables según la especie (Nishikawa *et al.*, 1970).

Heteropolisacáridos: Desde principios de siglo existen datos de polisacáridos con manosa y galactosa (Ulander y Tollens, 1906) aunque los datos exactos acerca de la homogeneidad, estructura, etc. son sin duda más recientes y cada vez más numerosos. El procedimiento para aislarlos es el descrito por Karrer y Joos (1924): tras una extracción con agua caliente se precipitaban con solución de Fehling, aunque en ocasiones otros protocolos son requeridos. La cantidad relativa de este tipo de polisacárido varía según la especie y puede llegar a ser un componente predominante como en *Peltigera aphtosa*, en el que constituye el 48% del peso seco del talo. En otros casos puede ser sólo el 0,5%.

La mayoría de las investigaciones estructurales de estos galactomananos han sido realizadas por el equipo de Iacomini y Gorin. En una de las revisiones, Teixeira *et al.* (1995) han propuesto, a la vista de los trabajos realizados por varios autores, la existencia de 5 grupos (más uno misceláneo) basándose en la zona anomérica de los espectros de ^{13}C RMN. Esta clasificación muestra la existencia de similitudes intragenéricas e intrafamiliares aunque en algunos casos existían marcadas diferencias dentro del mismo género y familia.

Las estructuras de estos galactomananos parecen ser únicas y complejas. En general están constituidas por un esqueleto de α -(1→6)-manosa con diferentes sustituyentes (por los que pueden diferenciarse). Gorin y Iacomini (1984) aislaron los galactomananos de *Cetraria islandica* y *Ramalina usnea* hallando dos tipos de estructuras diferentes para cada especie. La unidad repetitiva de la primera y segunda especie se representan en la Figura 5.

En un estudio comparativo de especies de *Cladonia* (Iacomini *et al.*, 1985) se observó que los polisacáridos que precipitaban con la solución de Fehling eran similares entre ellos pero distintos a los de otros géneros. Sin embargo, los polisacáridos que no precipitaban mostraron diferencias significativas entre las distintas especies comparadas, incluyendo dos cuya morfología externa es casi indistinguible (*C. confusa* y *C. alpestris*). En general, dichos sobrenadantes estaban constituidos principalmente por galactofuranosa, que es un componente común entre los ficobiontes.

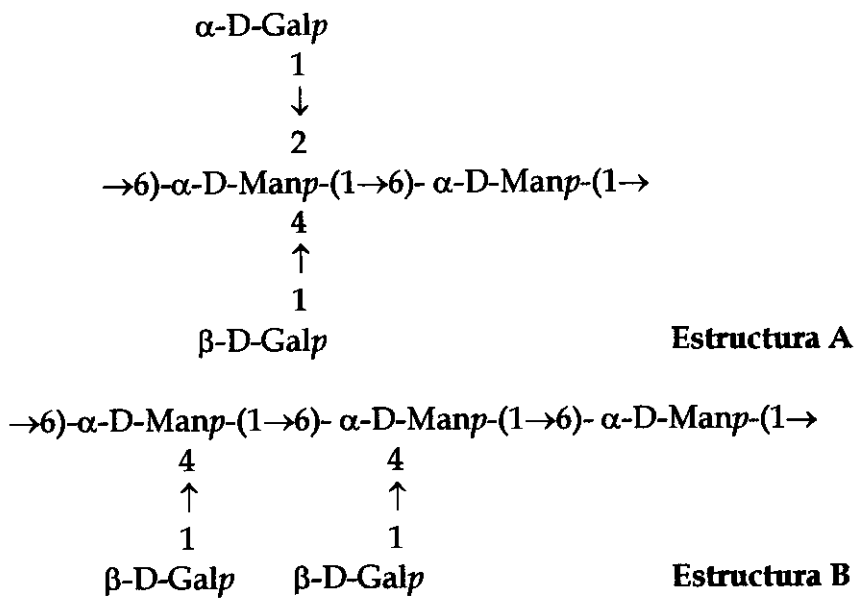


Figura 5. A: Galactomanano muy ramificado de *C. islandica*. B: Galactomanano de *R. usnea*.

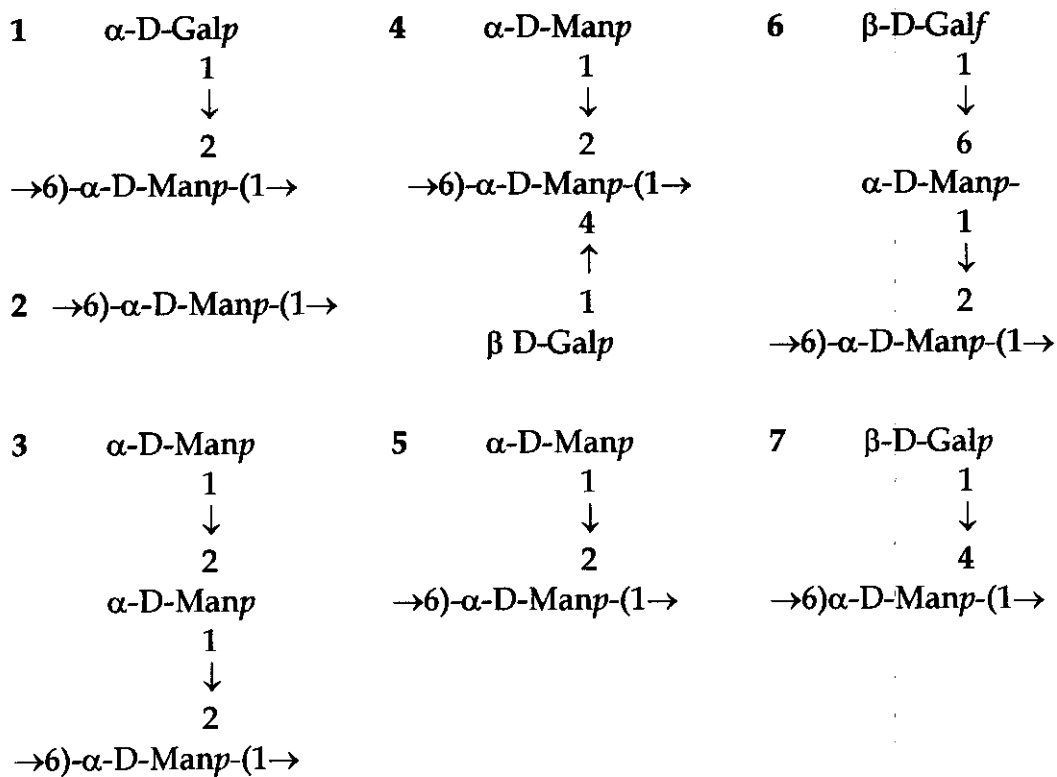


Figura 6. Diferentes fragmentos de estructuras propuestas para los galactomananos de varias especies de *Cladonia*. Figura tomada de Woranovicz et al., (1997).

Woranovicz *et al.*, (1997) estudiaron estos galactomananos en otras especies de *Cladonia* (*C. signata*, *C. imperialis*, *C. furcata*, *C. clathrata*) concluyendo que tienen fragmentos de estructuras en común (Figura 6) y se diferencian por la abundancia de cada una de ellos.

Heteropolisacáridos de algunas especies de la familia Umbilicariaceae han sido estudiados por Kjølberg y Kvernheim (1989). En dicho trabajo, realizan una extracción con álcali. El material polisacarídico que obtienen se fracciona por columna de intercambio iónico, obteniendo varias fracciones con una composición en monosacaridos diferente. Analizan la fracción mayoritaria y concluyen que las dos especies estudiadas, *U. pustulata* y *U. spodochoa* tienen un galactomanano similar cuya estructura básica repetitiva es α -D-Manp-(1→6) con uniones en O-2, O-4 (6 ambas) de cadenas cortas de α -D-Manp-(1→2) ó (1→3). Toda la galactosa eran unidades de β -D-galactofuranosa unida a la cadena principal por O-4 ó como secuencias de β -D-Galf-(1→3) ó (1→5). Las diferencias observadas entre las especies se debían a abundancia de las diferentes cadenas laterales.

De *Evernia prunastri* también se han logrado aislar heteropolisacáridos (Teixeira *et al.*, 1994) cuyas estructuras básicas coinciden con los fragmentos 1, 4 y 5 de la figura 6 pero además contienen cadenas laterales de α -D-Galp-(1→2)-D-Glcp- y α -D-GlcpA-(1→3)-D-Glc-. Este tipo de polisacárido según los autores es similar a los descritos en *Parmotrema cetratum*, *P. sulcata*, *Cetraria islandica* y *Usnea* spp., pudiendo indicar alguna relación del micobionte.

Dentro del género *Stereocaulon*, Takahashi y colaboradores (1981) observaron que existían especies cuyo componente soluble en agua fría (de una extracción con agua caliente) podía ser bien un glucano β -(1→6), bien un heteropolisacárido conteniendo galactosa, manosa y glucosa. El componente insoluble era en ambos casos el glucano citado.

De los hongos basidiomicetos liquenizados también se han aislado heteropolisacáridos en muy pequeña cantidad y sus estructuras han resultado bien diferentes de las demás, estando constituidos principalmente por una

cadena de α -D-Manp-(1→3) sustituida en posición O-4 ó en O-4 y O-2 por β D-Xilp (Iacomini *et al.*, 1987).

2.4. Aplicaciones de los polisacáridos

En el apartado anterior ya hemos hablado de una de las posibles aplicaciones de los polisacáridos fúngicos: el empleo como marcadores quimiotaxonómicos. Ya en 1968, Bartnicki-García agrupó los hongos en ocho divisiones utilizando los componentes mayoritarios de la pared: quitina y glucanos. Posteriormente los trabajos de Leal y Bernabé (1998) han demostrado que en la fracción soluble en álcali y agua de las paredes celulares de numerosos Ascomycetes se encuentra un heteropolisacárido característico para cada género o grupo de hongos relacionados. Este heteropolisacárido es constitutivo de la pared ya que es sintetizado siempre y puede relacionar los anamorfos con sus teleomorfos correspondientes. Un ejemplo de la aplicación de los polisacáridos en taxonomía es el llevado a cabo por Ahrazem *et al.* (1999) en el que al analizar los heteropolisacáridos característicos de la pared de *Penicillium vermoesenii* determinan que su estructura es similar a la de otros heteropolisacáridos del género *Fusarium* y no coincide con la de aquéllos aislados de *Penicillium*. Ésto, junto al estudio de morfología del hongo, les lleva a proponer que *P. vermoesenii* está más relacionado con *Fusarium* que con *Penicillium* o *Gliocladium*.

En los hongos liquenizados, Teixeira *et al.* (1995) propusieron este tipo de heteropolisacárido, que también se hallaba en el talo aunque de forma más compleja, como un marcador que relacionaría los tipos de hongos entre sí.

Desde otro punto de vista, los polisacáridos han sido frecuentemente utilizados como inhibidores de procesos tumorales y replicación vírica. Centrándonos en aquellos aislados de líquenes podemos citar los experimentos de Hirabayashi *et al.* (1989), quienes utilizando un β -(1→6) glucano parcialmente acetilado y posteriormente sulfatado de *Umbilicaria esculenta* lograron inhibir *in vitro* el efecto citopático del virus HIV y suprimir la expresión antigénica en las células Molt-4. Este tipo de polisacárido, extraído

de diversas especies de la misma familia Umbilicariaceae, también ha sido ensayado en la inhibición de sarcoma-180 implantado en ratones. En la experiencia mostró un efecto en dicha inhibición positivo, aunque también se detectaron cambios hepáticos (Nishikawa *et al.*, 1970). En otra serie similar de estudios se ensayaron diferentes extractos acuosos de distintas especies: *Evernia*, *Acroscyphus* y *Alectoria* que fueron caracterizadas como glucanos con distintas proporciones de enlaces α -(1→3)(1→4) y β -(1→3)(1→4). Los resultados de inhibición del sarcoma fueron en algunos casos del 100% (Takeda *et al.*, 1972). Más actualmente Carneiro y colaboradores (1997) demostraron que un glucano α -(1→3)- α -(1→4) extraído de *Ramalina celastri* tenía efecto citotóxico contra células HeLa. Incluso en plantas de tabaco el liquenano se mostró, entre otros polisacáridos ensayados, eficiente en la inhibición vírica (Stübler y Buchenauer, 1996).

Con el desarrollo de varios métodos como el enzimoimmunoensayo o la inmunofluorescencia indirecta se han probado las propiedades antigénicas de varios heteropolisacáridos y así han podido detectarse contaminantes fúngicos en alimentos (Kamphuis, 1992) o enfermedades en el hombre o animales (Zimmerman *et al.*, 1989).

3. FILOGENIA Y EVOLUCIÓN

El estudio de la filogenia de los hongos liquenizados resulta bastante complejo. En ello influyen tanto las condiciones peculiares de estos organismos (dualidad micobionte-fotobionte) como los diversos puntos de vista y formas de abordar este problema.

Gargas (1995), analizó la relación de numerosos líquenes, utilizando material genético del micobionte que comprendía 250 secuencias alineadas de ADN nuclear de la subunidad pequeña del ribosoma (SSU rADN). Demostró el origen polifilético de estos organismos ya que la simbiosis se va desarrollando en el tiempo y puede surgir en varios grupos de forma independiente. Parece demostrado entonces que el hongo puede pertenecer a diferentes grupos, pero,

sin embargo, el alga parece mostrar menor variación genotípica (De Priest, 1999).

Centrándonos en los hongos liquenizados Euascomicetos la evolución y posición sistemática de los diferentes grupos que lo componen también es controvertida. Basándose en la morfología del apotecio, Tehler (1996) propone unas posibles relaciones entre los ordenes, pero existe controversia con los resultados de algunos análisis basados en marcadores genéticos (Berbee y Taylor, 1992). Las relaciones entre las familias pertenecientes a un mismo orden también son estudiadas por técnicas moleculares, así como la circunscripción de géneros a una determinada familia (Crespo y Cubero, 1998). Los estudios de este tipo son bastante recientes por lo que se hace necesario una intensificación de los mismos así como la búsqueda de otros marcadores que corroboren las hipótesis filogenéticas.

OBJETIVOS

Los objetivos que se persiguen podrían clasificarse dentro de dos tipos.

1. Cualitativos, para llegar a conclusiones de carácter taxonómico:

Dentro de este tipo se incluye el aislamiento, purificación y determinación de la estructura de los componentes polisacarídicos de talos de diversas especies de líquenes pertenecientes a diferentes familias del orden Lecanorales: Parmeliaceae, Umbilicariaceae y Cladoniaceae. La determinación de las estructuras polisacarídicas permitirá, mediante comparación, realizar inferencias acerca de la posición taxonómica de cada grupo de géneros aquí relacionados.

2. Cuantitativos, para llegar a conclusiones de carácter ecofisiológico:

Dentro de este tipo se incluye la cuantificación estacional de las diferentes fracciones a lo largo de varios ciclos anuales. Se emplearán dos tipos de talos pertenecientes a dos especies diferentes con notables diferencias en cuanto a su selección de hábitat (considerando, además, diversas variables de carácter ambiental). Se llevará a cabo una aproximación estadística al análisis estacional de la variabilidad observada.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL EMPLEADO

1.1. Familia Parmeliaceae

- *Platismatia glauca* (L.) Culb. et Culb. fue recogida el 21 de enero de 1998 sobre *Pinus sylvestris* en Valsaín, Navacerrada, Madrid a 1450 m.
- *Pseudevernia furfuracea* L. (Zopf) fue recogida el 20 de marzo de 1997 sobre *Pinus sylvestris* en Valsaín, Navacerrada, Madrid a 1450 m.

1.2. Familia Umbilicariaceae

- *Lasallia pustulata* (L.) Hoffm. recogida el 20 de marzo de 1997 sobre roca granítica en La Silla de Felipe II, San Lorenzo del Escorial, Madrid.
- *Lasallia hispanica* (Frey) Sancho & Crespo recogida el 13 de julio de 1997 sobre roca granítica en el puerto de La Morcuera, Madrid a 1430 m.
- *Umbilicaria polyphylla* (L.) Baumg. recogida el 20 de septiembre de 1997 sobre roca granítica en el puerto de La Morcuera, Madrid a 1430 m.
- *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Harm. subsp. *crustulosa* Lich. recogida el 20 de septiembre de 1997 sobre roca granítica en el puerto de La Morcuera, Madrid a 1430 m.

1.3. Familia Cladoniaceae

- *Cladonia rangiformis* Hoffm. recogida el 27 de noviembre de 1997 sobre suelo calizo en la Urbanización Los Reguerones, Toledo a 1000 m.
- *Cladonia foliacea* (Huds.) Willd. recogida el 27 de noviembre de 1997 sobre suelo calizo en la Urbanización Los Reguerones, Toledo.
- *Cladonia iberica* recogida el 27 de noviembre de 1997 sobre suelo calizo en la Urbanización Los Reguerones, Toledo.

2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS

Del material desecado se empleó de 30 a 100 g para la extracción de los polisacáridos. El procedimiento de dicha extracción se muestra en la Figura 7.

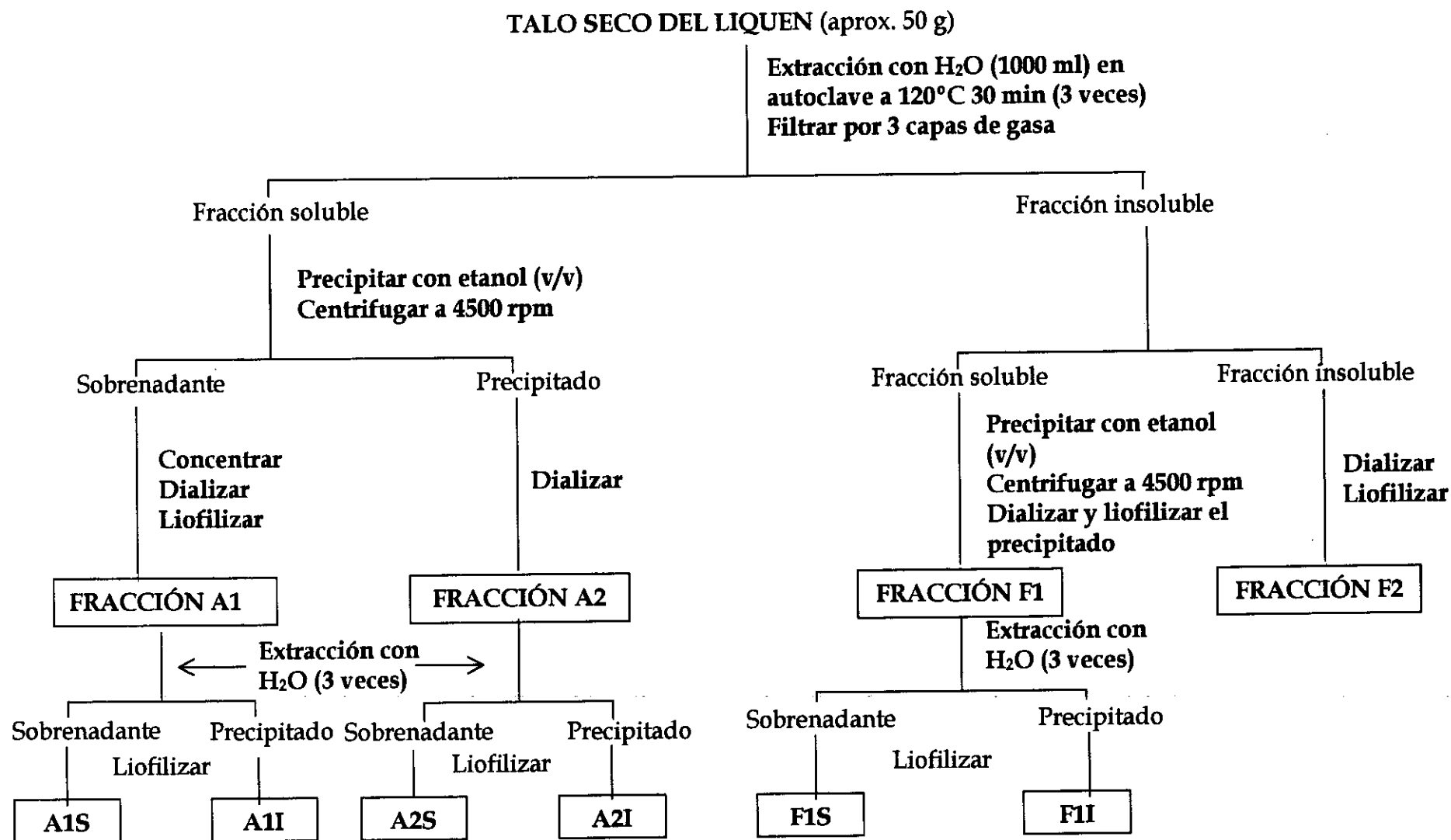


Figura 7. Esquema de un primer fraccionamiento de los polisacáridos de las especies recolectadas.

Previamente, los talos fueron lavados tres veces con agua del grifo y una vez con agua destilada, separando cuidadosamente otros contaminantes vegetales. En el caso de las especies de *Cladonia*, al estar en contacto con el suelo, los talos fueron exhaustivamente lavados y raspados hasta que no parecieron desprender más tierra. Se secaron en estufa con corriente de aire a 60°C.

En este primer fraccionamiento, el número de veces que se extrajo el talo, bien con agua o con sosa, no fue el mismo en cada especie. Las extracciones se continuaron hasta que no se apreció precipitación en los extractos al tratarlos con etanol.

2.1. Familia Parmeliaceae.

Las dos especies de esta familia se comportaron de manera similar en el proceso de extracción de los componentes polisacáridicos. Se realizaron tres extracciones con agua y tres con sosa 1 M.

La fracción A1 (200 mg) se resuspendió en 10 ml de H₂O destilada y se centrifugó 15 min a 4000 rpm. El sobrenadante se denominó A1S y el precipitado A1I.

La fracción A2 se centrifugó 15 min a 4000 rpm, lavándose el precipitado con H₂O destilada tres veces. Los sobrenadantes se juntaron y liofilizaron (A2S). El precipitado se liofilizó (A2I).

De la fracción F1 se tomaron 2 g para diferenciar la parte soluble en agua F1S de la insoluble, F1I, mediante 4-5 extracciones con 50 ml H₂O.

2.2. Familia Umbilicariaceae

Para obtener los polisacáridos de las especies de esta familia se realizaron de tres a cuatro extracciones con agua en autoclave y tres extracciones con álcali.

La fracción A1 después de dializar se liofilizó.

A2 después de dializar se centrifugó 15 min 4000 rpm, lavándose el precipitado con H₂O destilada tres veces. Los sobrenadantes A2S se juntaron y liofilizaron. El precipitado A2I se liofilizó.

La fracción F1 tuvo el mismo tratamiento que la anterior.

2.3. Familia Cladoniaceae

Sólo se realizó una extracción con agua en autoclave y tres con NaOH, 24 h a T^a ambiente. Al obtener mucho residuo después de las extracciones con álcali, se realizaron cuatro extracciones más con NaOH 1 M (500 ml cada una) en autoclave, denominándose F1 1. Después del dializado se separaron por centrifugación dos fracciones, una soluble en agua (F1 1S) y otra insoluble (F1 1I). La fracción F2 fue el residuo que quedó después de estas extracciones. El resto de las fracciones se trataron igual que en la familia Parmeliaceae.

2.4. Precipitación con solución de Fehling y propanol

2.4.1. Licor de Fehling

El licor de Fehling ha sido utilizado por diversos autores (e.g., Aspinall *et al.*, 1977) para precipitar selectivamente polisacáridos con enlaces (1→6).

Las fracciones solubles en agua (200 mg), se resuspendieron en 10 ml de H₂O destilada. Después de centrifugar se obtuvo, en algunos casos, un pequeño precipitado que se diferenció en la nomenclatura adoptada añadiendo una "I" al nombre de la fracción correspondiente. A los sobrenadantes se añadieron 5 ml de solución de Fehling separándose un precipitado por centrifugación. El sobrenadante (en la nomenclatura seguida, añadiremos "SC") se dializó en primer lugar frente a HCl 10 mM (para eliminar el cobre restante) y después frente a agua. A continuación se filtró por una resina mixta AG 501-X8 (D) y se liofilizó.

Para eliminar el cobre fijado a los polisacáridos precipitados con el reactivo de Fehling, (en la nomenclatura seguida añadiremos "PC") se adicionó bien HCl 10mM, dializándose frente a agua, o bien resina DOWEX H⁺ 50 WX 4, centrifugando. El producto final se liofilizó en ambos casos.

2.4.2. Precipitación con propanol

Las fracciones de F1S fueron sometidas a precipitación diferencial con propanol (Corsaro, *et al*, 1998): 25-100mg de estas fracciones se disolvieron en 1 ml de H₂O destilada, adicionando 0.8 ml de 2-isopropanol y dejándolo precipitar toda la noche en nevera. Se centrifugaron a 4000 rpm separando un sobrenadante (diferenciado en la nomenclatura al agregar "SP" al final del nombre de la fracción) y un precipitado (diferenciado en la nomenclatura al agregar "PP" al final del nombre de la fracción).

2.5. Fraccionamiento en columna

2.5.1. Fraccionamiento en columna de exclusión molecular

100 mg de fracción soluble disueltos en 2 ml de agua destilada se centrifugó a 13000 rpm 15 min. El sobrenadante se cargó en dos tipos de columnas:

- Columna de Sephacril S-300 (90 x 2,5 cm) en condiciones de FPLC en un equipo LKB (bomba Pharmacia P-500) con agua destilada como eluyente a un flujo 2 ml/min.
- Columna de Sepharose CL-6B (90 x 2,5 cm) con agua destilada como eluyente a un flujo 0,6 ml/min.

En ambos casos se recogieron fracciones de 3 ml determinándose su contenido en carbohidratos mediante el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al*. 1956). Se tomaron 50 µl de muestra y se añadieron 250 µl fenol al 5% en agua y 1,25 ml ácido sulfúrico, midiendo el valor de la absorbancia a 485 nm. Para comprobar que en cada pico eluía un solo polisacárido, en lugar de reunir todas las fracciones del mismo se tomaron lotes de 5 tubos (15 ml) y se liofilizaron por separado para analizarlos por ¹H-RMN.

Las columnas se calibraron con patrones de dextrano T-500, T-70, T-10 y vitamina B₁₂. Pesos moleculares: 500.000 Da, 70.000 Da, 10.000 Da y 1.355 Da respectivamente.

2.5.2. Fraccionamiento en columna de intercambio iónico

Entre 100 y 200 mg de fracción soluble en agua se resuspendió en 3 ml de H₂O destilada y centrifugó a 13000 rpm 15 min. El sobrenadante se cargó en

una columna de DEAE Sepharose CL-6B (30 x 4 cm. Flujo 0,3ml/min, 4ml/tubo), equilibrada con tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Se eluyó una fracción neutra con tres veces el volumen de la columna (en la nomenclatura se agregó una "n" al final del nombre de la fracción) y otra al aplicar un gradiente con cinco veces el volumen de la columna (en la nomenclatura se agregó una "g" al final del nombre de la fracción) de NaCl de 0 a 1M. Cada tubo se controló por fenol-sulfúrico de la misma forma que el caso anterior y los correspondientes a un mismo pico (el n° de pico si hubo más de uno se indicó entre paréntesis) se juntaron, concentraron, dializaron y liofilizaron.

2.6. Procesado de las fracciones insolubles A2I y F1I

A2I y F1I se sometieron a dos procesos sucesivos: un lavado con agua, que no rindió una fracción significativamente diferente, y un posterior tratamiento con sosa. En este último tratamiento se realizaron de tres a cinco lavados y centrifugados con NaOH 1 M. Tras la diálisis de las dos partes, se diferenciaron tres fracciones:

- un residuo insoluble en álcali (A2I *a*, F1I *a*)
- otra que se hizo soluble en sosa y que al dializar 3 días frente a agua se mantuvo soluble (A2I *b* F1I *b*)
- y por último, otra que precipitó en dicha diálisis (A2I *c*, F1I *c*).

2.7. Complejo glucano-quitina

100 mg de F2 se sometieron a hidrólisis parcial (HCl 0,5 M 1 h 100°C; Boissiere, 1987) con objeto de destruir el polisacárido residual y liberar el glucano asociado a la quitina. Se obtuvo un sobrenadante F2S y un resto F2I al que se le adicionó 30 ml NaOH 1 M (3 veces) dejando un residuo F2I *a* y solubilizando un glucano, F2I *b*.

3. ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS POLISACÁRIDOS

3.1. Determinación de proteínas

La valoración colorimétrica de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (1976).

Una cantidad de 0,8 ml de muestra conteniendo 10 µg de polisacárido se mezcló con 0,2 ml de reactivo sin diluir, leyendo la absorbancia a 595 nm. -las lecturas obtenidas se refirieron a una curva de seroalbumina bovina de 5-20 µg/ml.

3.2. Determinación de los ácidos urónicos

Para la detección de los ácidos urónicos se utilizó el método colorimétrico del carbazol (Bitter y Muir, 1962). La muestra conteniendo 50-500 µg de ácidos se completa a 0.5 ml con agua destilada y añaden 3 ml de ácido sulfúrico en frío, calentando en agua hirviendo durante 15 min. La mezcla se enfrió y se añadió 0.1 ml de carbazol al 0,1% en etanol dejándolo reaccionar durante 2 h y midiendo la absorbancia a 525 nm.

3.3. Reducción de los polisacáridos ácidos

Este tratamiento facilita el análisis por metilación de los polisacáridos que contienen grupos carboxilo, ya que al reducirlos con borodeuteruro sódico, el ión que contiene el hidroxilo correspondiente al carboxilo reducido presentará dos unidades más de masa, debidas a la incorporación de dos átomos de deuterio. Para la reducción de los polisacáridos se empleó el método descrito por Taylor y Conrad (1972). Primero 15 mg del polisacárido se pasan por resina intercambiadora de iones DOWEX 50WX 4, añadiendo después 400 mg de carbodiimida y ajustando el pH a 4.7 con HCl si fuera necesario. Se dejó en agitación 2 h. Entonces se adicionó 5 mg de borodeuteruro sódico y se ajustó el pH a 7.0 dejándolo 1h en agitación. Se dializó frente a agua al menos 3 días y liofilizó.

3.4. Hidrólisis de los polisacáridos

Los polisacáridos (5-10 mg) se hidrolizaron con 1 ml de ácido en diferentes condiciones:

- Hidrólisis con H_2SO_4 2M, durante 5 h a 100°C .
- Hidrólisis con TFA 5M, 1 h a 120°C .
- Hidrólisis con TFA 5M, 5 h a 100°C .

3.5. Derivatización y análisis de los polisacáridos

3.5.1. Preparación de acetatos de alditol

Después de hidrolizar, se añadió 1 mg de inositol como patrón interno y se procedió a la eliminación del ácido, neutralizando con exceso de BaCO_3 en el caso del H_2SO_4 , o por evaporación en rotavapor en el de TFA. Los productos de la hidrólisis de los polisacáridos son sustancias no volátiles, por ello fue necesario derivatizarlos para su identificación posterior por CGL. Después de eliminar el BaSO_4 insoluble por centrifugación, la muestra se seca en estufa de aireación y se resuspende en 1 ml de H_2O . Se añadió de 1 A10 mg de borohidruro sódico, dejando reducir durante la noche los monosacáridos formados. Posteriormente el exceso de borohidruro se eliminó con HCl 12.5 N, se secó en rotavapor y se lavó 3 veces con 2 ml de metanol. De entre los derivados que pueden formarse, se eligieron los acetatos de alditol por producir un único derivado volátil de cada monosacárido, dando lugar a cromatogramas más simples. Para ello se adicionó 250 μl de anhídrido acético y 250 μl de piridina, calentando la muestra 1h a 100°C y secándola después en rotavapor (Laine *et al.*, 1972). Los azúcares neutros fueron identificados y cuantificados mediante CGL de acuerdo con el método utilizado por Gómez-Miranda *et al.*, (1981).

3.5.2. Cromatografía gas-líquido

Se empleó un equipo de la casa Perkin Elmer, modelo Autosystem, con detector de ionización de llama, utilizándose una columna de sílice fundida SPB-1 (30 m x 0,25 mm; 0,25 μm espesor de la película). El gas portador fue helio a una presión de 30 psi. Inyector y detector se programaron a una

temperatura de 250°C. Los distintos componentes de la muestra se separaron mediante un programa de temperaturas que comienza isotérmicamente a 180°C y se mantiene durante 4 min. para luego subir a razón de 15°C min⁻¹ hasta los 240°C, temperatura que se mantiene durante 8 min. El tiempo total del análisis fue de 16 min. El pico de cada azúcar en el cromatograma se identificó comparando su tiempo de retención con los de patrones analizados en idénticas condiciones. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos y a los factores de respuesta de los azúcares.

3.5.3. Metilación de los polisacáridos

La metilación efectiva del polisacárido depende del grado de ionización de los hidroxilos libres, por tanto, es fundamental efectuar la reacción en un medio básico con el fin de conseguir que dichos grupos hidroxilo se transformen en alcóxilos. Existen varios métodos de metilación. En este trabajo se utilizó el método de Ciucanu y Kerek (1984) modificado por Needs y Selvendran (1993).

El polisacárido (1-3 mg), previamente reducido si contenía ácidos urónicos, se disolvió completamente en 1 ml de DMSO en un baño ultrasónico. Se añadieron entre 50 y 100 mg de hidróxido sódico, sonicando durante 25 minutos. A continuación se enfrió el tubo y se añadió 0,5 ml de yoduro de metilo, dejándolo sonicar 2 h. Los productos de la reacción, recogidos con 2 ml de cloroformo-metanol (1:1), se dializaron frente a agua durante 48 h, posteriormente frente a etanol-agua (1:1) durante 24 h y finalmente, se evaporaron a sequedad.

El polisacárido metilado se hidrolizó para obtener azúcares parcialmente metilados, que se redujeron y acetilaron para convertirlos en sus correspondientes acetatos de alditol parcialmente metilados. La reducción y acetilación se realizó según el método de Laine y col. (1972) con una única modificación, que consistió en reducir con NaBD₄

3.5.4. Rotura reductora

El método utilizado fue descrito por Gray (1987). Consiste en la rotura reductora de todos los enlaces glicosídicos en un polisacárido totalmente metilado, obteniéndose anhidroalditoles parcialmente metilados que una vez acetilados, se analizaron directamente por CGL-EM. Este método permite distinguir entre la piranosas sustituidas en O-4 y furanosas sustituidas en O-5.

Los tubos empleados para la reacción, junto con un imán pequeño, fueron sililados con 300 µl de piridina y 300 µl de BSTFA en agitación durante 1 h a temperatura ambiente, para evitar problemas que se originan por la presencia de trazas de agua. A continuación, se vaciaron y se enjuagaron con 2 ml de metanol. Por último se mantuvieron en una estufa a 120°C durante 30 min., dejándolos enfriar en el interior de un desecador.

El polisacárido permetilado (0,5-1 mg) se disolvió en 2 ml de diclorometano seco y se pasó a un tubo previamente sililado. Se secó bajo atmósfera de argón. Con agitación vigorosa, se añadieron rápidamente 100 µl de trietilsilano y 100 µl de triflato de trimetilsililo, se burbujeó argón antes de tapar y se puso de nuevo en agitación a T.A. durante 5-6 h. Al cabo de este tiempo, se añadieron 2 ml de metanol y una resina intercambiadora DOWEX AG 501-X8(D) (Bio-Rad) para neutralizar. Se dejó reaccionar durante unos 15 min agitando y se comprobó el pH, que tiene que ser neutro. A continuación se filtró a través de algodón y se lavó 3 veces con 1 ml de metanol la resina. Los sobrenadantes se juntaron y este filtrado se evaporó a sequedad en el rotavapor a temperatura ambiente. Después se acetiló por adición de 0,25 ml de piridina y 0,25 ml de anhídrido acético, calentando a 100°C durante 1 h. Los acetatos de anhidroalditol parcialmente metilados obtenidos fueron sometidos a un análisis combinado CGL-EM, en una columna capilar de sílice fundida de SPB-1 (30 m x 0,25 mm; espesor de la película 0,25 µm). Se utilizó un programa de temperaturas que comienza a 150°C (3 min) para luego subir, a razón de 3°C min⁻¹, hasta 210°C.

3.5.5. Análisis de espectrometría de masas

Los acetatos de alditol parcialmente metilados, se analizaron mediante CGL-EM en un cromatógrafo de gases modelo Autosystem de Perkin-Elmer, con una columna capilar de sílice fundida de SPB-1 (30 m x 0,25 mm; espesor de la película 0,25 μm), con helio como gas portador.

Se utilizó un programa de temperaturas que comenzaba con 160°C durante 1 min para luego subir, a razón de 2°C min⁻¹, hasta 200°C y los compuestos eluidos se detectaron con un detector de masas Q-Mass de Perkin-Elmer. La ionización se llevó a cabo por impacto electrónico. La fragmentación que experimentan los acetatos de alditol parcialmente metilados mediante impacto electrónico, ha sido estudiada con gran detalle (Jansson *et al.*, 1976). De los fragmentos primarios y secundarios obtenidos en el espectro de masas, se deduce el tipo de sustitución de los monómeros en la mayoría de los casos, excepto en el caso de furanosas sustituidas en O-5 y las piranosas sustituidas en O-4 (Latgé *et al.*, 1994; Mischnick y De Ruiter, 1994). La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos en los cromatogramas obtenidos por CGL-EM.

3.6. Obtención del núcleo de manosa

En galactomananos con cadenas laterales de galactofuranosa podemos obtener el núcleo central de manosa hidrolizando parcialmente con H₂SO₄ 0.1 N 5h, 100°C que rompen dichas cadenas laterales de galactofuranosa y dejan libre un núcleo resistente de manosa. Tras la diálisis el núcleo así obtenido se liofilizó.

Si las cadenas laterales son de galactopiranosas la hidrólisis parcial debe ser más fuerte, con TFA 0.16 M, 18h, 100°C (Woranovicz *et al.*, 1997)

3.7. Acetólisis del polisacárido

Mediante este método (Stewart y Bayou, 1968) se hidrolizan selectivamente los enlaces (1→6). De este modo, 50-100 mg del polisacárido purificado que se desee estudiar se resuspenden en 50 ml de anhídrido acético: ácido acético: ácido sulfúrico en proporción 10:10:1 manteniéndose tres días en agitación.

Posteriormente se añadieron 50 ml de agua y los fragmentos acetilados del polisacárido se extrajeron con 100 ml de cloroformo (2 veces). La capa orgánica se lavó 3 veces con agua y se secó. Después se resuspendió en 20 ml de metóxido sódico (30mg Na en 20ml metanol) dejándose desacetilar 20 min. Se centrifugó y se lavó el residuo con metanol, juntando los sobrenadantes y llevándolos a sequedad en rotavapor. Al disolverlo en agua se neutralizó con resina DOWEX 50WX 4 que fue eliminada por centrifugación. El sobrenadante neutralizado se llevó a sequedad en rotavapor.

3.8.Oxidación con periodato y degradación de Smith

50 mg de polisacáridos insolubles (A2I y F1I) se suspendieron en 25 ml de H₂O adicionando otros 25 ml de periodato sódico 0.03M. Se realizó también un blanco y un patrón con 3.33 μ mol/ml de glucosa. Cada día y empezando por el 1º(T0), se toman 20 μ l de muestra y se diluyen en 5 ml de H₂O, midiendo la absorbancia a 223 nm. Cuando el consumo de periodato se estabiliza, se da por terminada la oxidación.

Después de la oxidación con periodato la muestra se dializó frente a agua y a continuación se añadió 75 mg de borhidruro sódico dejándola reducir 16 h (T.A.). Tras una nueva diálisis se liofilizó. El polisacárido resultante se sometió a hidrólisis y derivatización de la forma en que se describió en los apartados 3.4, 3.5.1 y 3.5.2.

Los azúcares que contengan grupos hidroxilo contiguos son oxidados a dialdehidos con ruptura entre los dos carbonos del azúcar y consumo de 1 molécula de peryodato por molécula de azúcar. Si los residuos contienen grupos hidroxilo en tres carbonos adyacentes se produce también en la oxidación ácido fórmico, como es el caso de los polisacáridos con uniones (1→6). Para oxidarse necesitan 2 moléculas de peryodato por molécula de monosacárido, rindiendo una molécula de dicho ácido. Después de la hidrólisis se obtendrá glicerol. Las unidades no terminales unidas por enlaces (1→2) ó (1→4) se rompen con una molécula de peryodato, no liberando ácido fórmico y dan después de la hidrólisis eritritol o treitol. Los polisacáridos con enlaces

(1→3) no se degradan, obteniéndose los monómeros que habían antes del proceso.

3.9. Determinación de N-acetilglucosamina

3.9.1. Hidrólisis de la quitina

5-10 mg de la fracción F2I *a* se sometió a dos tipos de hidrólisis:

- HCl 6N, 4 h a 100°C. El residuo se centrifugó (F2I *aI*) y la parte soluble (F2I *aS*) fue la empleada en los análisis colorimétricos.
- H₂SO₄ 6N, 4 h a 100°C. El residuo se centrifugó (F2I *aI*) y la parte soluble (F2I *aS*) fue la empleada en los análisis colorimétricos.

3.9.2. Método colorimétrico

A F2I *aS* se adicionó 2 ml de H₂O y se tomó 0.2 y 0.4 ml para las determinaciones, llevándose a sequedad en rotavapor. Posteriormente se añadió 1 ml de H₂O y 0.25 ml de reactivo acetilacetona incubándolo 1h a 90°C. Tras enfriar se añadió 2 ml de etanol absoluto y 0,25 ml de reactivo de Erlich, dejándolo reaccionar 15 min a t.a. La absorbancia se midió a 530 nm. Recta patrón de 10 a 100 µg de N-acetil-glucosamina.

Reactivo de acetilacetona: acetilacetona al 4% en carbonato sódico 1.25 N.

Reactivo de Erlich: 1,6 g de p-dimetilbenzaldehído. 30 ml de etanol. 30 ml de HCl conentrado.

3.9.3. Identificación de glucosamina por HPLC

10µl de la fracción F2I *aS* (hidrolizada de la forma descrita en el apartado anterior) se inyectaron en una columna de HPLC y se determinaron los aminoazúcares empleando para ello métodos estandarizados.

3.10. Análisis elemental del residuo

Después de la hidrólisis este residuo se dializó y secó para analizar sus componentes esenciales por analizador de masas.

3.11. Determinación de grupos acetilos

50 mg de A2S se suspendieron en 50 ml NaOH 0.02 M 16 h a temperatura ambiente. Se llevaron a sequedad en rotavapor y se resuspendieron en 5 ml de agua de los que se tomó 1 ml añadiendo 1 ml de patrón interno ácido propionico (1 mg/ml) y 0.2 ml de ac. sulfúrico al 50%. Las sales formadas se extrajeron con eter etílico en frío, quedándonos con la fase orgánica. Se analizó por cromatografía de gas-líquido con programa isoterma a 140°C.

4. MÉTODOS FÍSICOS DE ANÁLISIS DE LOS POLISACÁRIDOS

4.1. Espectroscopía de infrarrojos

De 0.5 a 3 mg de polisacárido se maceraron con 300 mg de KBr para formar una pastilla en una prensa Perkin-Elmer. El espectro se realizó en un espectrómetro Bruker IFS 28 Equinox.

Los espectros de IR se obtuvieron con el fin de determinar si existía contaminación proteica y dar una idea del tipo de polisacárido que era. Además nos dan información sobre la configuración α o β del polisacárido en algunos casos, así como la presencia de grupos de tipo N-acetilo, carboxilo o sulfato que tienen unas bandas características (Barker y col., 1956). Para detectar la presencia de ácidos urónicos, los polisacáridos se analizaron en forma ácida, previo paso por una resina intercambiadora de iones DOWEX 50WX 4.

Además el espectro de infrarrojos puede confirmar el grado de metilación del polisacárido ya que cuando ésta es completa, desaparece la banda a 3500 cm^{-1} característica de los grupos hidroxilos libres del carbohidrato.

4.2. Ionización desorción por láser asistida por matriz-espectrometría de masas de tiempo de vuelo: MALDI-TOF

Con este método se determinaron los pesos moleculares de los oligosacáridos de muestras provenientes de acetolisis. Para ello se preparó una solución de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (10 mg/ml), mezclándose volumen a volumen con la muestra.

4.3. Resonancia magnética nuclear

La espectroscopia de RMN a diferencia de otros métodos físicos, no es una técnica destructiva y por ello es posible examinar un polímero sin degradarlo ni modificarlo, recuperando el material intacto. La aplicación de las técnicas de RMN actuales permite, en determinados casos, obtener la secuencia de los polisacáridos.

El espectro monodimensional de ^1H -RMN proporciona los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento de los residuos que componen el polisacárido. Los protones anoméricos de las hexosas tienen su zona de resonancia separada de la del resto de los protones de la molécula, lo que permite determinar el número de monosacáridos diferentes (o iguales, pero con entornos distintos) que tiene el polisacárido y la estereoquímica de los enlaces glicosídicos (α o β).

Las muestras se prepararon disolviendo de 10 a 30 mg de polisacárido en 0,7 ml de D_2O y centrifugando a 10.000 g durante 20 min para eliminar precipitados. Los espectros de ^1H -RMN se registraron a 40°C , en un aparato Varian XL-300 a 300 MHz. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ) con relación al pico residual de HOD (4,61 ppm a 40°C).

5. ESTUDIO DE LAS VARIACIONES ESTACIONALES DE LAS FRACCIONES POLISACARÍDICAS.

5.1. Recogida del material

El material fue recogido en las siguientes localidades:

Pseudevernia furfuracea L. (Zopf):

- sobre tronco de *Pinus sylvestris* en Valsaín, a 1450 m. Madrid.

UTM: 30TVL142191.3

- sobre ramas de *Pinus sylvestris* en el margen de la presa del Pradillo, Río de la Angostura (Lozoya), a 1000 m. Madrid. UTM: 30TVL256228.

Lasallia pustulata (L.) Mérat:

➤ sobre roca granítica en el melojar de La Silla de Felipe II. El Escorial. Madrid. UTM: 30TVK025915.

5.2. Extracción de los polisacáridos

Se tomaron muestras de 15 g de talos en cada localidad a finales de los siguientes meses: agosto 1997, noviembre 1997, enero 1998, mayo 1998, agosto 1998, noviembre 1998, enero 1999 y mayo 1999. Tras lavar tres veces con agua y separar bien otros materiales, se secaron en estufa de aireación a 60°C. Se realizaron tres repeticiones del protocolo de extracción, partiendo de 5 g de talo cada vez, como se muestra en el esquema de la Figura 8. No se realizó una purificación de la fracción A1 de las dos especies, ni de A2 de *L. pustulata*.

La fracción A2 (*P. fufuracea*) se dividió en 4 partes, con 50-200 mg de muestra en cada lote. Cada uno de ellos se resuspendió en 40 ml de agua caliente, se congeló, descongeló y centrifugó separando el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces con agua fría. Los sobrenadantes se juntaron y se obtuvieron, tras liofilizar, dos fracciones: A2S (soluble en agua fría) y A2I (insoluble).

La fracción F1 (*Lasallia* y *Pseudevernia*) se dividió en cinco partes, con 50-200 mg de muestra cada una. Estos lotes se resuspendieron en 40 ml de agua caliente, se congelaron, descongelaron y centrifugaron a 4500 rpm, separando el sobrenadante y lavando tres veces con agua fría el precipitado. Los sobrenadantes se juntaron y, tras liofilizar, se obtuvieron dos fracciones: F1S (soluble en agua fría) y F1I (insoluble).

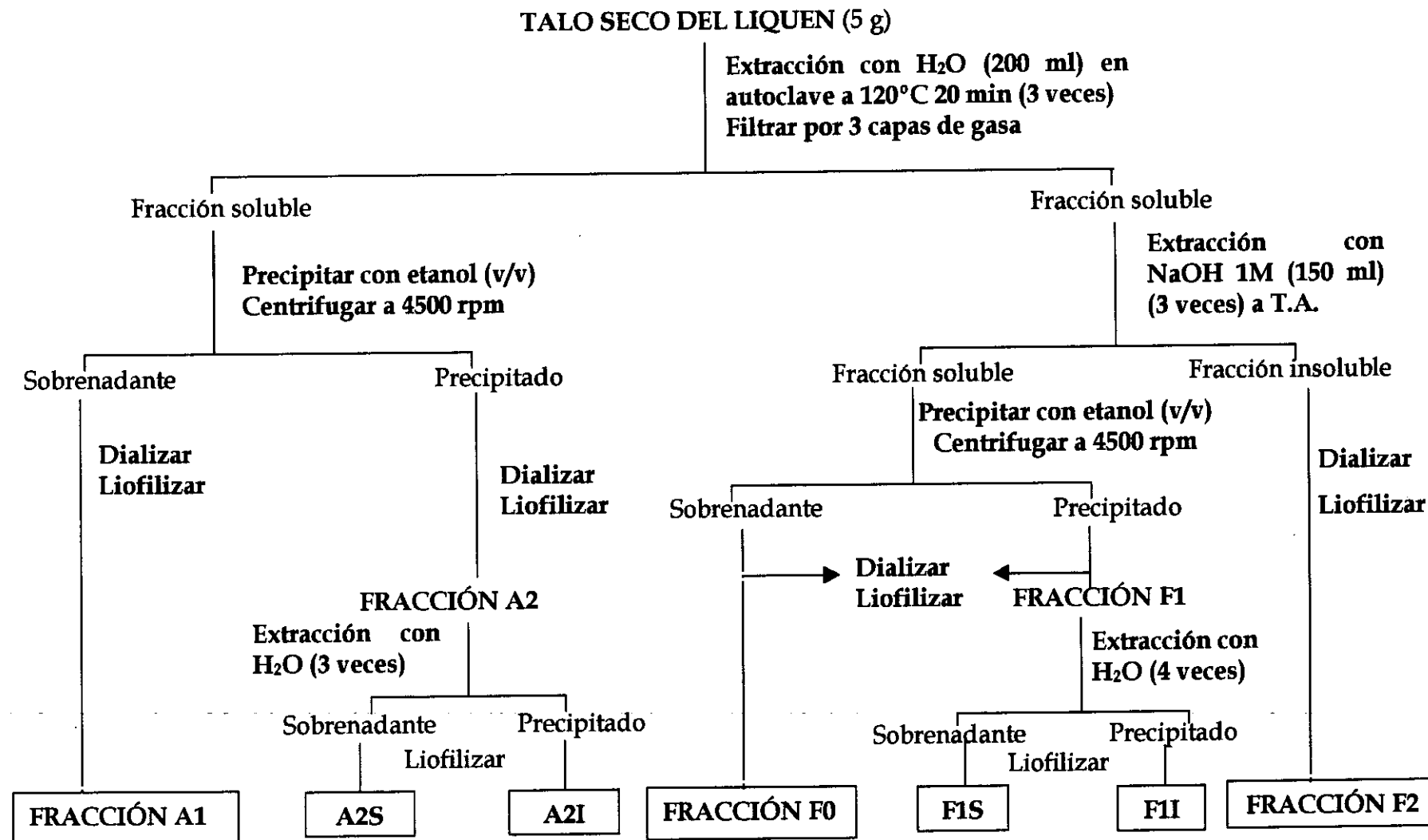


Figura 8. Protocolo de extracción de polisacáridos para el análisis estacional.

5.3. Variables meteorológicas

Los valores medios mensuales de temperatura, precipitación y días de niebla se obtuvieron a partir de los registros de las estaciones meteorológicas cercanas: Puerto de Navacerrada (llamada 'Puerto'), Rascafría (llamada 'El Paular') y San Lorenzo del Escorial (llamada 'Llanillos'). De esta última sólo se obtuvieron los datos del periodo comprendido entre diciembre de 1997 a mayo de 1999. Del resto de estaciones meteorológicas se dispuso de datos para todo el periodo estudiado (agosto 1997-mayo 1999). Para el análisis estadístico se calcularon los valores medios trimestrales de cada una de estas variables.

5.4. Análisis estadístico

Los procedimientos estadísticos empleados para el análisis de los datos estacionales son los siguientes:

5.4.1. Correlaciones simples entre fracciones

Para verificar la existencia o no de relación lineal entre las proporciones de las diferentes fracciones dentro de cada especie, se realizaron correlaciones simples entre los pesos de las fracciones (A1, A2S, A2I, F0, F1S, F1I y F2) en cada estación del año para cada una de las dos especies. Al estar calculando muchas estimaciones, la probabilidad de que alguna de ellas sea significativa por azar es alta. Por este motivo, se aplicó la corrección de Bonferroni.

5.4.2. Correlaciones simples entre fracciones y variables ambientales

Para verificar si la variación en los pesos de las fracciones estaba relacionada con variaciones de tipo ambiental, se llevaron a cabo correlaciones simples entre estos pesos (fracciones A1, A2S, A2I, F0, F1S, F1I y F2) y las medias de las tres variables ambientales por separado: temperatura, precipitación y días de niebla (para cada una de las dos especies). Como en el anterior caso, se aplicó la corrección de Bonferroni.

5.4.3. Análisis de las componentes principales

Para comprobar la consistencia de los resultados anteriores se realizó una nueva aproximación, empleando en este caso un método multivariante, el Análisis de las Componentes Principales (PCA). Con este procedimiento

estadístico las variables que están correlacionadas se agrupan entre sí en factores independientes, disminuyendo el número de comparaciones a realizar. Se realizó un PCA diferente para cada especie. Las variables incluidas dentro de cada PCA fueron los pesos de todas las fracciones (A1, A2S, A2I, F0, F1S, F1I y F2). El conjunto de variables empleado fue previamente normalizado mediante transformación logarítmica. Se realizó rotación de los ejes (Varimax). Dentro de cada análisis, sólo se consideraron los factores con autovalores mayores que 1 (Nie *et al.* 1975). Los componentes principales obtenidos en cada PCA fueron correlacionados con las variables ambientales, también normalizadas, citadas anteriormente.

5.4.4. Análisis de la varianza múltiple

Para determinar la existencia de diferencias estacionales entre el conjunto de los pesos de todas las fracciones (consideradas conjuntamente dada su naturaleza polisacáridica común) se llevaron a cabo análisis de la varianza múltiples (MANOVA) para cada una de las especies estudiadas. Los factores incluidos en el modelo fueron la estación del año (4 categorías), el año (2 categorías) y, en el caso de *Pseudevernia*, se incluyó un factor población (2 categorías). En éste último caso, el modelo de MANOVA fue reducido, considerándose solo los efectos simples (efecto estación del año, efecto año y efecto población), así como el efecto triple o interacción entre estos tres factores. Los demás efectos no aportan información relevante alguna, por lo que no se consideran. Se incluyeron como variables dependientes los pesos de las fracciones A2S, A2I, F1S, F1I y F2 logaritmizadas. Las fracciones A1 y F0, al ser sobrenadantes y estar correlacionadas con algunas de las anteriores fracciones (o precipitados) no fueron incluidas en este análisis. Previamente se demostró estadísticamente que tal exclusión no afectaba a los resultados, empleando para ello un análisis de covarianza múltiple (MANCOVA). En éste, se compararon los pesos de las fracciones A2S, A2I, F1S, F1I y F2 empleando los tres factores antes citados y, como covariantes, las fracciones A1 y F0 (Tabla 1 para *Pseudevernia* y Tabla 2 para *Lasallia*).

Todas las fracciones			
Factor	λ de Wilks	F	p
Estación	0,105	7,709	0,000*
Población	0,667	3,294	0,016*
Año	0,301	15,325	0,000*
Interacción	0,384	2,526	0,004*

Tabla 1. Resultados del MANCOVA de las fracciones A2S, A2I, F1S, F1I y F2 de *Pseudevernia* con covariantes A1 y F0. Con asterisco se resaltan los resultados estadísticamente significativos.

Todas las fracciones			
Factor	λ de Wilks	R (Rao)	p
Estación	0.033	6.423	<0.000*
Año	0.271	7.392	<0.004*
Interacción	0.023	7.827	<0.000*

Tabla 2. Resultados del MANCOVA de las fracciones A2S, A2I, F1S, F1I y F2 de *Lasallia* con covariantes A1 y F0. Con asterisco se resaltan los resultados estadísticamente significativos.

5.4.5. Análisis de la varianza parciales

Para investigar la existencia de diferencias estacionales dentro de cada una de las fracciones estudiadas (A1, A2S, A2I, F0, F1S, F1I y F2, consideradas por separado en este caso) se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) empleando como variable dependiente cada una de las fracciones anteriores y con 2 o 3 factores (*Lasallia*, 2 factores: estación del año y año); (*Pseudevernia*, 3 factores: estación del año, año y población). En aquellos casos en los que el peso del precipitado estuvo correlacionado con el del sobrenadante (o pudiera afectar en alguna medida) se incluyó éste en el análisis como covariante, con el fin de eliminar su efecto (ANCOVA).

En todos los casos, los requerimientos de normalidad de las muestras y residuos se cumplieron (test de Shapiro-Wilk: todas las variables $p>0,09$). Los test de paralelismo no resultaron significativos. La homogeneidad de la muestra se cumplió mayoritariamente.

5.5. Estudio cualitativo estacional en la fracción F1S de *L. pustulata*.

Para conocer si existía variación en la composición del polisacárido según el paso del tiempo, se escogió la fracción F1S de *L. pustulata* para realizar un estudio estructural. Para ello, 120 mg de dicha fracción extraída en cada una de las 8 estaciones (desde agosto de 1997 a mayo de 1999) se purificaron por cromatografía de intercambio iónico, según se detalla en el apartado 2.5.2. Las fracciones purificadas se trataron con propanol (apartado 2.4.2) y los productos separados mediante este tratamiento se analizaron por GC-MS (apartado 3.5.2.) y ^1H -RMN (apartado 4.3).

RESULTADOS

1. FAMILIA PARMELIACEAE.

1.1.Resultados del fraccionamiento

Talos de *P. furfuracea* y *P. glauca* fueron sometidos al protocolo de extracción descrito en el apartado 2 de Material y Métodos.

Las fracciones mayoritarias en ambas especies fueron A2I (extraída con agua en autoclave e insoluble en agua fría), F1I (extraída con álcali e insoluble en agua fría) y F2 (residuo de las extracciones anteriores, insoluble en agua y álcali) (Figura 9).

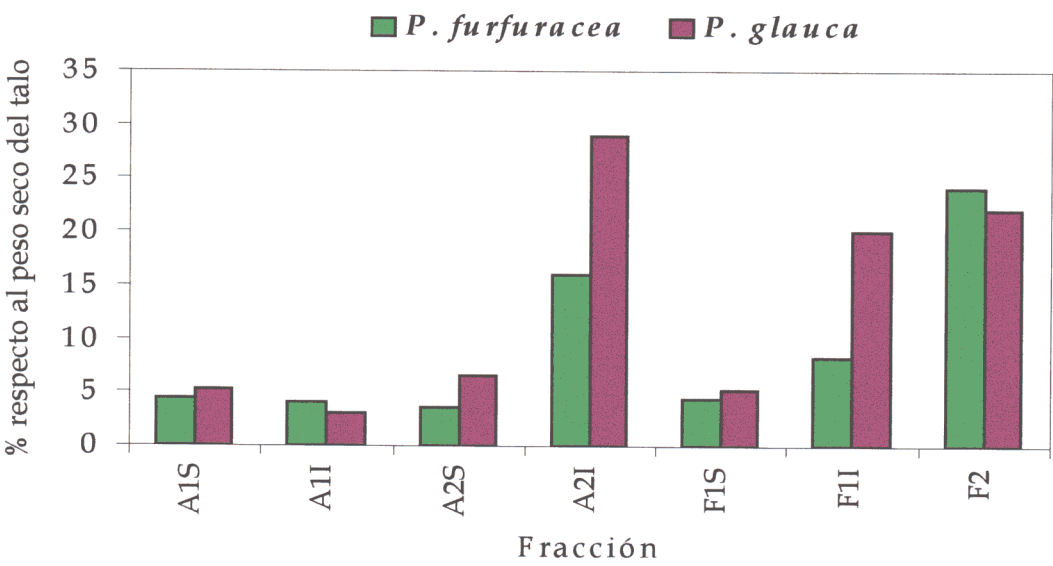


Figura 9. Porcentajes de fracciones extraídas respecto a gramo de talo seco.

1.2.Análisis preliminar de las fracciones extraídas con agua (A1 y A2)

El espectro de infrarrojos de la fracción soluble en agua fría (A1S) mostró bandas intensas a 1650 y 1560 cm⁻¹ características del grupo -CO-NH- de las proteínas. La determinación colorimétrica mediante el método de Bradford, dio un contenido de proteínas del 20%. El rendimiento en monosacáridos de esta fracción en las dos especies (Tabla 3) fue muy bajo probablemente debido a que contenía otros monómeros ácidos o fenoles, además de las proteínas.

El espectro de A2S mostró bandas a 800, 850 y 930 cm⁻¹ confirmando la existencia de enlaces tipo α en el polisacárido. Aunque el monosacárido mayoritario fue glucosa, también contuvo manosa y galactosa (Tabla 3).

Los espectros de las fracciones A1I, en las dos especies estudiadas, mostraron bandas específicas de lípidos (1740, 2850 y 2920 cm⁻¹) que confirmaban también que el bajo rendimiento de monosacáridos obtenido en la hidrólisis ácida de esta fracción era debido a su presencia y no a una hidrólisis incompleta.

Las fracciones polisacarídicas insolubles de las dos especies (A2I) estaban constituidas principalmente por glucosa (Tabla 3). Su espectro de infrarrojos fue similar en las dos especies, mostrando la banda característica de enlaces tipo β (890 cm⁻¹).

1.3.Análisis preliminar de las fracciones extraídas con NaOH (F1)

El residuo de la extracción con agua fue extraído con NaOH 1M obteniéndose las fracciones polisacarídicas F1S y F1I. En la fracción F1S el monosacárido más abundante fue galactosa seguido de manosa y glucosa (Tabla 3).

Monosacáridos	<i>P. furfuracea</i>						
	A1S	A1I	A2S	A2I	F1S	F1I	F2
xilosa	-	2	-	-	-	-	-
ramnosa	-	3	-	-	-	-	-
arabinosa	-	-	-	-	-	-	2
manosa	11	8	12	5	20	19	13
galactosa	10	9	11	4	36	14	11
glucosa	5	8	55	86	12	13	16
Total:	26	20	78	95	68	46	43

Monosacáridos	<i>P. glauca</i>						
	A1S	A1I	A2S	A2I	F1S	F1I	F2
ramnosa	2	-	-	-	2	-	-
arabinosa	-	1	-	-	-	1	-
manosa	12	5	12	2	17	22	14
galactosa	11	3	9	-	18	17	10
glucosa	9	7	17	50	11	26	16
Total:	32	16	39	52	48	67	40

Tabla 3. Porcentajes de los monosacáridos obtenidos tras hidrólisis de las distintas fracciones, determinados mediante cromatografía de gases como acetatos de alditol.

En *P. glauca* se detectó además una pequeña cantidad de ramnosa. Su espectro de infrarrojos resultó similar al de algunos mananos descritos por otros autores, con bandas a 810, 880 y 920 cm^{-1} .

El monosacárido predominante de la fracción insoluble en agua (F1I) fue glucosa y en su espectro de infrarrojos se observó una banda a 890 cm^{-1} . La presencia de manosa y galactosa en proporciones pequeñas, así como otras bandas en el espectro a 810 y 780 cm^{-1} pusieron de manifiesto la posible complejidad de la muestra.

1.4. Análisis de la fracción F2

La hidrólisis del material insoluble con agua caliente y álcali (F2) liberó, en ambas especies, manosa, galactosa y glucosa (Tabla 3). El rendimiento en azúcares neutros fue bajo (40-43%), ya que este residuo podría contener también N-acetilglucosamina, como indicaban las bandas a 1560 y 1650 cm^{-1} de su espectro de infrarrojos. Se eligió la fracción F2 de la especie *P. furfuracea* para tratar de separar los componentes de la muestra mediante hidrólisis parciales con ácido seguido de extracciones con NaOH (apartado 2.7. de Material y Métodos). Los porcentajes de las fracciones, fueron : F2I (insoluble en ácido): 12% de los cuales se obtuvieron dos fracciones, F2I *b* (fracción extraída con NaOH): 4%, F2I *a* (residuo de la extracción): 8%.

El espectro de infrarrojos (banda de absorción a 890 cm^{-1}) y el análisis de monosacáridos de la fracción F2I *b* demostraron que era un β -glucano.

La fracción F2I *a*, después de ser lavada con metanol y NaOH 1M, se sometió a hidrólisis ácidas con HCl y con H_2SO_4 (apartado 3.9. de Material y Métodos). La determinación colorimétrica de aminoazúcares en los hidrolizados rindió porcentajes similares para las dos hidrólisis ensayadas. % de aminoazúcares respecto a F2I *a*: HCl: 9,3%, H_2SO_4 : 9,5%.

Al analizar los hidrolizados por HPLC se identificó el aminoazúcar como glucosamina, en proporciones similares (5-11%) a las detectadas mediante el método colorimétrico.

El residuo final, (F2I aI) se analizó mediante espectroscopía de infrarrojos (Figura 10). El análisis elemental rindió los siguientes porcentajes de los elementos hallados:

59,2% de Carbono, 7% de Hidrógeno, 1,3% de Nitrógeno y 32,4% de Oxígeno. La fórmula empírica deducida de estos resultados fue:

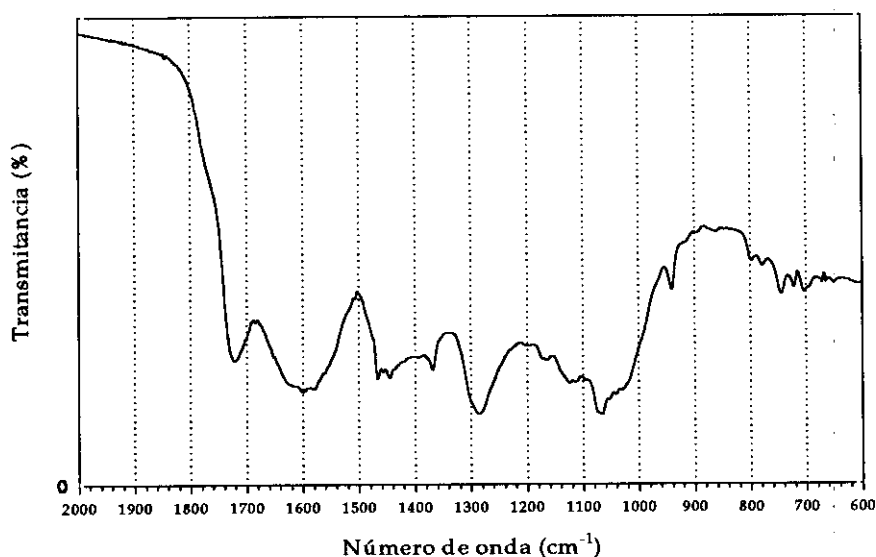
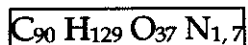


Figura 10. Espectro de infrarrojos del último residuo (F2I aI) del talo de *Pseudevernia furfuracea*.

1.5. Purificación de las fracciones solubles A2S y F1S

1.5.1. Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones solubles

Las fracciones A2S y F1S (200 mg) se resuspendieron en un pequeño volumen de agua (2 ml) y se centrifugaron, reservando el sobrenadante.

Al resuspender en agua dichas fracciones, se obtuvo una pequeña cantidad (menor del 5%) de un residuo insoluble (A2S I, F1S I) compuesto de glucosa principalmente (Tabla 4).

El material que permaneció soluble después de centrifugar se liofilizó (A2S S y F1S S) y su composición monosacáridica se recoge en la Tabla 4. 100 mg de cada una

de estas fracciones se disolvió en agua y se cargó en una columna con gel de Sepharose CL 6B (apartado 2.5.1. de Material y Métodos) para su análisis mediante cromatografía de exclusión molecular.

Se recogieron fracciones de 4 ml y, en cada pico detectado mediante el método colorimétrico del fenol-sulfúrico, se hicieron lotes compuestos por el contenido de 5 tubos consecutivos, liofilizándolos. Al material de estos lotes se hizo un espectro de ^1H -RMN observándose diferencias entre ellos. Esto significaba que había una mezcla de polisacáridos en estas fracciones que no se podía separar con el gel de Sepharose CL 6B.

1.5.2. Tratamiento con reactivo de Fehling. Determinación de monómeros

Como las dos fracciones solubles (A2S y F1S) contenían manosa (Tabla 3), se decidió tratarlas con solución de Fehling (apartado 2.4. de Material y Métodos), que precipita preferentemente mananos en configuración (1 \rightarrow 6), separándolos así de otros polisacáridos que quedan en solución tras el tratamiento. En ambas especies se obtuvo un precipitado.

El sobrenadante (fracciones A2S SC y F1S SC) representó proporciones semejantes en las dos especies (4-2% del total). Pero los porcentajes de monosacáridos de las fracciones A2S SC y F1S SC fueron diferentes (Tabla 4). Las fracciones que precipitaron con reactivo de Fehling, A2S PC y F1S PC (1-2%), mostraron un mayor contenido en manosa y galactosa que la muestra original y que el sobrenadante particular (Tabla 4). El espectro de infrarrojos de éstas fue similar para las dos especies estudiadas. Se apreciaron bandas a 785, 810, 880, 915 y 980 cm^{-1} que correspondían en su mayoría a bandas características de α -mananos descritos por otros autores (Michell y Scurfield, 1969). También se observó una banda a 1420 cm^{-1} (correspondiente a las sales de ácidos carboxílicos). Se llevó a cabo la determinación colorimétrica de los mismos mediante el método del carbazol. Los resultados del ensayo dieron porcentajes de ácido entre el 12% y el 20%.

Monosacáridos	<i>P. furfuracea</i>				<i>P. furfuracea</i>			
	A2S SC	A2S PC	A2S S	A2S I	F1S SC	F1S PC	F1S S	F1S I
arabinosa	-	-	-	-	-	-	1	-
manosa	14	24	14	9	17	36	20	10
galactosa	11	23	12	5	24	34	33	5
glucosa	36	10	32	73	19	9	20	55
Total:	61	57	58	87	61	78	74	70

Monosacáridos	<i>P. glauca</i>				<i>P. glauca</i>			
	A2S SC	A2S PC	A2S S	A2S I	F1S SC	F1S PC	F1S S	F1S I
xilosa	-	1	-	2	3	-	-	-
ramnosa	-	-	-	-	7	-	3	-
arabinosa	-	-	-	-	-	2	-	-
manosa	16	26	21	7	22	33	23	12
galactosa	13	21	17	5	24	27	32	8
glucosa	41	8	24	76	16	7	14	58
Total:	70	57	62	90	72	69	72	77

Tabla 4. Porcentajes de los monosacáridos obtenidos tras hidrólisis de las distintas fracciones, determinados mediante cromatografía de gases como acetatos de alditol.

1.5.3.Cromatografía de exclusión molecular mediante FPLC en Sephacryl S-300 y análisis de las fracciones obtenidas

Los polisacáridos separados mediante el tratamiento con solución de Fehling (sobrenadantes y precipitados) se filtraron por gel de exclusión molecular como se describe en el apartado 2.5.1. de Material y Métodos, para comprobar su pureza.

En la Figura 11 se aprecia que los polisacáridos eluían en un amplio rango debido a su naturaleza polidispersa.

El perfil de elución de las fracciones A2S SC de *P. glauca* y *P. furfuracea*, mostró un pico mayoritario de alto peso molecular, que se separó de una pequeña proporción de un componente de menor tamaño. La fracción principal se metiló para determinar los tipos de enlaces, detectándose los derivados procedentes de residuos de glucosa unida en (1→3) y (1→4) en proporciones 7:3 respectivamente. También se detectaron pequeñas cantidades (<10%) de galactosa y manosa. El espectro de infrarrojos reveló bandas características del isoliquenano a 800, 845 y 925 cm⁻¹ (Figura 12).

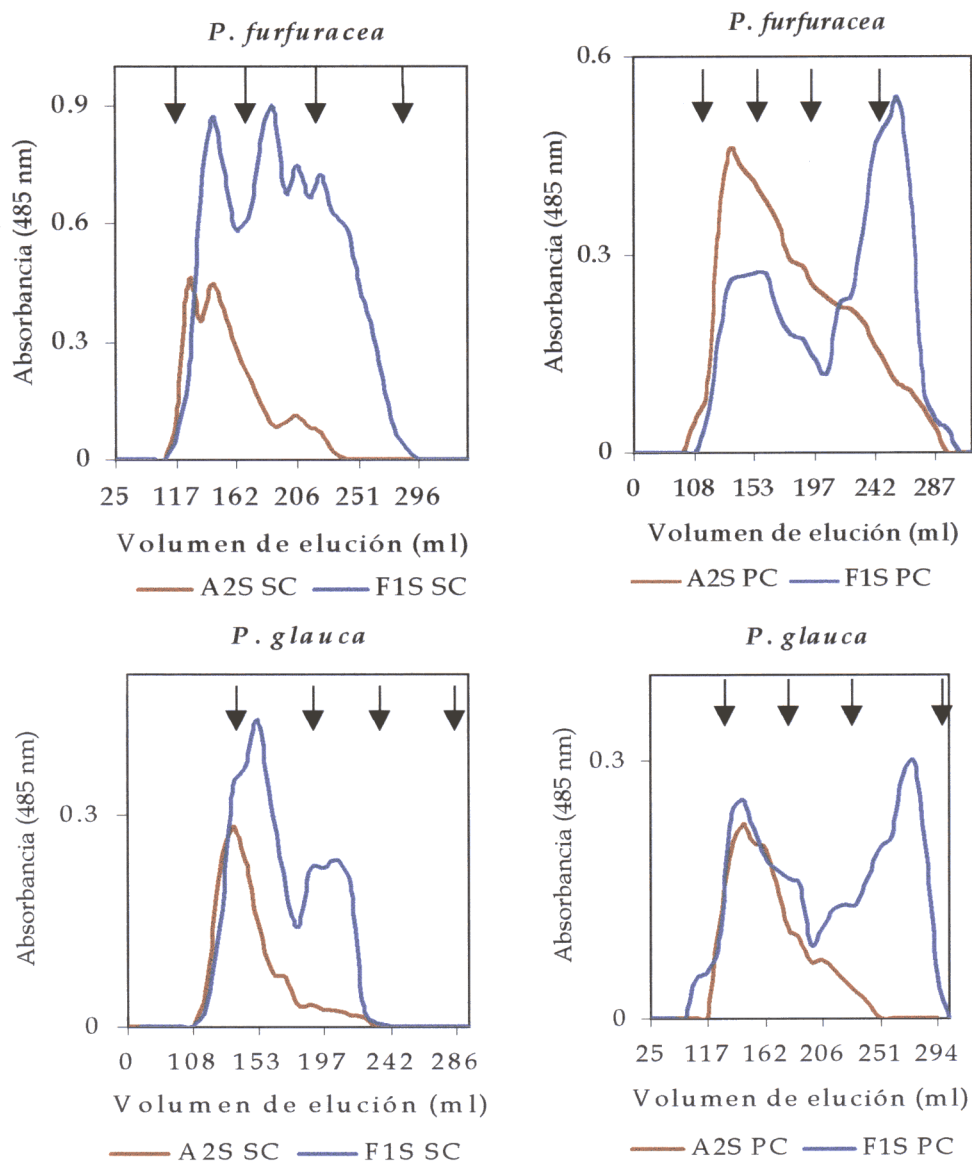


Figura 11. Separación en columna de Sephacryl S-300 en FPLC de las fracciones solubles en agua fría obtenidas tras precipitar con solución de Fehling. Las flechas indican la zona de elución de los patrones dextrano T-500, T-70, T-10 y vitamina B 12.

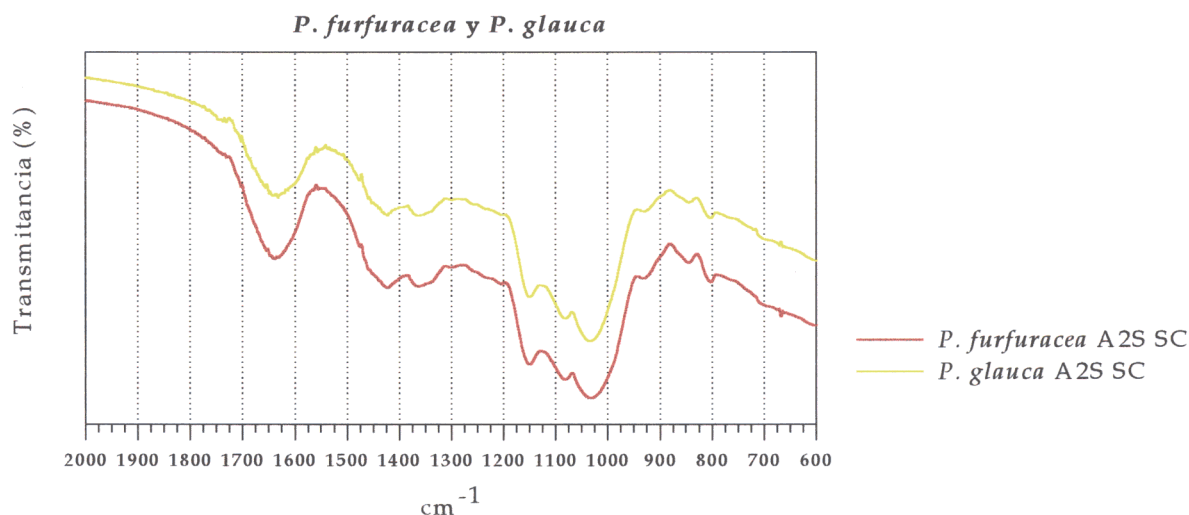


Figura 12. Espectros de infrarrojos de las fracciones A2S SC de *P. furfuracea* y *P. glauca*.

En la fracción A2S PC se obtuvo un solo pico que ocupó la mayor parte del perfil de elución. Los análisis de ¹H-RMN mostraron que en él coelúan un manano (mayoritario) y un glucano.

La fracción F1S SC de las dos especies eluyó en dos picos (Figura 11). En el polisacárido del primer pico se detectó mayoritariamente 2,5,6-trimetil-galactofuranosa, derivado obtenido a partir de galactofuranosa unida en (1→3). En el polisacárido del pico segundo, los residuos mayoritarios fueron 2,3,5,6- y 2,3,4,6-tetrametil-galactosa y 3,4,6-trimetil-manopiranosas, procedentes respectivamente de residuos terminales de galactofuranosa y galactopiranosas y de manopiranosas unidas en (1→2).

El perfil de elución de la fracción F1S PC mostró la presencia de dos picos en ambas especies (Figura 11), siendo mayoritario el de menor peso molecular. Por análisis de metilación y resonancia magnética nuclear, se observó que ambas fracciones eran parecidas y además, su espectro de RMN era muy semejante al de la fracción A2S PC. Los residuos identificados tras la metilación fueron galactopiranosas terminal, manopiranosas unidas en (1→6), (1→2,6) y (1→2,4,6) y glucosa enlazada en (1→3).

En general, el aislamiento de los polisacáridos mediante precipitación con solución de Fehling fue de gran utilidad para la purificación de F1S PC (residuos tras la metilación: galactopiranososa terminal, manopiranososa unida en (1→6), (1→2,6) y (1→2,4,6)), pero tiene dos inconvenientes importantes. Uno es la posibilidad de no recuperar el polisacárido libre de cobre, lo que puede acarrear problemas en el análisis de metilación y el segundo es que la muestra puede fragmentarse durante el tratamiento con HCl. Para evitar estos problemas y teniendo en cuenta que estos polisacáridos contenían ácidos urónicos, se llevó a cabo otro tipo de purificación que presumiblemente no alteraría las propiedades de la muestra, cuyos resultados se describen a continuación.

1.5.4. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacrose CL 6B

La fracción F1S se filtró por gel de intercambio iónico como se describe en el apartado 2.5.2. de Material y Métodos, para separar sus componentes. En la Figura 13 se muestran los perfiles de elución de la cromatografía.

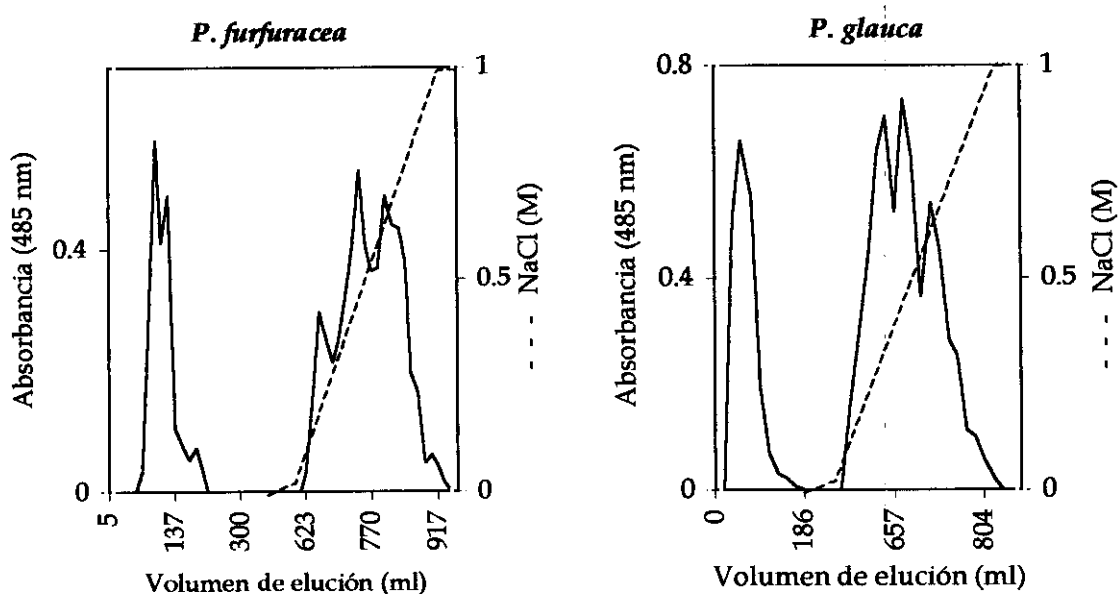


Figura 13. Cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-Sephacrose CL 6B de la fracción F1S de *P. furfuracea* y *P. glauca*.

En ambas especies se obtuvo una fracción que no se retenía, o fracción neutra denominada **F1Sn**. Parte del material quedó retenido en la columna y eluyó al aplicar el gradiente de NaCl, recogándose tres fracciones: **F1Sg(1)**, **F1Sg(2)** y **F1Sg(3)**.

1.5.5. Precipitación con 2-propanol

Aunque la fracción neutra eluyó en un solo pico, los análisis de ^1H -RMN parecían indicar que contenía una mezcla de productos. Lo mismo ocurría en las fracciones eluidas al aplicar el gradiente. Por ello, se trataron todas ellas con 2-propanol (apartado 2.4.2. de Material y Métodos) que precipita preferentemente mananos. En todos los casos, se separaron proporciones variables (Tabla 5) de un material, que precipitó al añadir un volumen de isopropanol, de otro polímero que permaneció en disolución. Es interesante destacar que en la fracción neutra de ambas especies se obtuvo más material soluble que precipitado, ocurriendo lo contrario en las fracciones gradientes.

F1S <i>P. furfuracea</i>				
FRACCIÓN	Fracción neutra F1Sn	Fracciones gradientes		
		F1Sg(1)	F1Sg(2)	F1Sg(3)
sobrenadante 1	10	3	2	1
precipitado 2	4	10	24	31

F1S <i>P. glauca</i>				
FRACCIÓN	Fracción neutra F1Sn	Fracciones gradientes		
		F1Sg(1)	F1Sg(2)	F1Sg(3)
sobrenadante 1	12	7	1	2
precipitado 2	2	11	15	15

Tabla 5. Porcentajes de las fracciones, después de filtrar por columna y precipitar con propanol respecto a la fracción inicial F1S. El porcentaje restante hasta llegar a 100 corresponde al residuo (F1SI).

1.6. Metilación y análisis de las fracciones F1Sn y F1Sg

Los espectros de ^1H -RMN de las fracciones obtenidas tras la precipitación con isopropanol de la fracción neutra indicaron que no se había conseguido una buena separación de la mezcla de polisacáridos que lo componían. Los espectros de ^1H -RMN de las fracciones gradientes que no precipitaron con isopropanol, que eran minoritarias, parecían contener una mezcla de polisacáridos en *P. furfuracea*. En el caso de *P. glauca* no rindieron carbohidrato. Por tanto se descartó un análisis posterior de todas estas fracciones, centrándonos en las fracciones gradientes que precipitaron con propanol. En primer lugar se realizó un carbazol para comprobar el porcentaje de grupos ácidos que contenían cada uno de los tres precipitados de las dos especies. En general el porcentaje hallado fue alto (variando del 4 al 20%) y en los dos casos, la fracción que eluyó en segundo lugar presentó mayor proporción de ácidos urónicos que la tercera. Por tanto, en algunos casos, antes de permetilar el polisacárido, se redujo el grupo $-\text{COOH}$ de los residuos de ácidos urónicos (apartado 3.5. de Material y Métodos), ya que sin esta etapa no se detectarían ni el residuo ácido ni el residuo contiguo a él. Los resultados se detallan en las Tablas 6 y 7.

Tipos de enlace	F1Sn SP	F1Sg(1) SP	F1Sg(1) PP	F1Sg(2) SP	F1Sg(2) PP	F1Sg(3) PP	Esq
Galp-(1→	trazas	22	37	29	37	40	-
Galf-(1→	8	34	-	24	-	-	-
→3)-Galf-(1→	1	-	-	-	-	-	-
→5)-Galf-(1→	28	-	-	-	-	-	-
→3)-Glcp-(1→	50	25	-	-	-	5	-
→4)-Glcp-(1→	14	2	-	-	-	-	-
→3,6)-Glcp-(1→	-	2	-	-	-	1	-
→3)-GlcpA-(1→	-	-	-	-	-	5	-
→2,3)-GlcpA-(1→	-	-	-	-	-	2	-
→3,6)-GlcpA-(1→	-	-	-	-	-	1	-
→2)-Manp-(1→	-	-	-	1	-	-	1
→6)-Manp-(1→	trazas	11	24	34	24	26	99
→2,6)-Manp-(1→	-	-	-	1	-	3	-
→2,4,6)-Manp-(1→	-	4	39	11	39	17	-

Tabla 6. Tipos de enlace deducidos de los análisis de metilación y rotura reductora de la fracción F1S de *P. glauca*. En el caso de la fracción F1Sg(3) PP, el polisacárido se redujo con NaBD_4 antes de la metilación.

Tipos de enlace	F1Sn SP	F1Sn PP	F1Sg(1) SP	F1Sg(1) PP	F1Sg(2) PP	F1Sg(3) PP
Galp-(1→	2	25	24	51	42	50
Galf-(1→	26	-	9	-	-	-
→3)-Galf-(1→	23	1	-	-	-	-
→5)-Galf-(1→	20	38	6	-	-	3
→3)-GlcP-(1→	6	9	25	2	11	6
→4)-GlcP-(1→	-	12	1	-	-	-
→2,3)-GlcP-(1→	5	-	-	-	-	-
→3,6)-GlcP-(1→	trazas	-	2	-	-	-
→2)-GlcPA-(1→	-	-	-	-	1	-
→3)-GlcPA-(1→	-	-	-	-	11	-
→2,3)-GlcPA-(1→	-	-	-	-	2	-
Hexp-(1→	trazas	-	9	-	2	-
→6)-Manp-(1→	1	9	12	26	19	25
→2,3)-Manp-(1→	-	-	3	-	-	-
→2,6)-Manp-(1→	trazas	5	8	3	9	-
→2,4,6)-Manp-(1→	-	1	1	18	12	16
→2)-Ramnp-(1→	4	-	-	-	-	-
→3)-Ramnp-(1→	1	-	-	-	-	-
→2,3)-Ramnp-(1→	7	-	-	-	-	-
Xilp-(1→	4	-	-	-	-	-

Tabla 7. Tipos de enlace deducidos de los análisis de metilación y rotura reductora de la fracción F1S de *Pseudevernia furfuracea*. En el caso de las fracción ácida del 2º pico, el polisacárido F1Sg(2) PP se redujo con NaBD₄ antes de la metilación.

Los tipos de enlace de los polisacáridos de las tres fracciones resultaron similares entre sí e idénticos a los que se encontraban al aislar el polisacárido precipitando con solución de Fehling (F1S PC).

1.7.Hidrólisis parcial de F1Sg(3) PP. Obtención y análisis del esqueleto de manosa.

Se eligió la fracción F1Sg(3) PP para profundizar más en la estructura de estos polisacáridos, realizando una hidrólisis parcial con TFA 0,1 M (apartado 3.6. de Material y Métodos). Con este tratamiento se consiguió obtener el “core” o esqueleto (Esq.) del polisacárido original, que resultó ser un (1→6) manano lineal igual en las dos especies estudiadas (Tabla 7). El espectro de infrarrojos de este esqueleto mostró bandas a 807-810, 875, 915-925 y 975 cm⁻¹.

1.8. Acetolisis de la fracción F1Sg(3) PP

La fracción F1Sg(3) PP de *P. furfuracea* fue sometida a hidrólisis parcial mediante acetolisis (apartado 3.7. de Material y Métodos). Al hidrolizar selectivamente los enlaces (1→6) componentes del núcleo del polisacárido, obtuvimos una mezcla de oligosacáridos, que contenían las cadenas laterales del polisacárido original. El tamaño molecular de estos fragmentos se analizó mediante espectrometría de masas de MALDI-TOF (Figura 14). Se detectaron fragmentos con las masas características del ion $[M+Na]^+$ de mono-, di-, tri-, tetra- y pentasacáridos de hexosas neutras, así como otros de m/z 703 y 865, característicos respectivamente de un tetrasacárido y un pentasacárido con un residuo de ácido hexurónico y los restantes residuos neutros.

En este caso no se detectaron oligosacáridos de alto Pm.

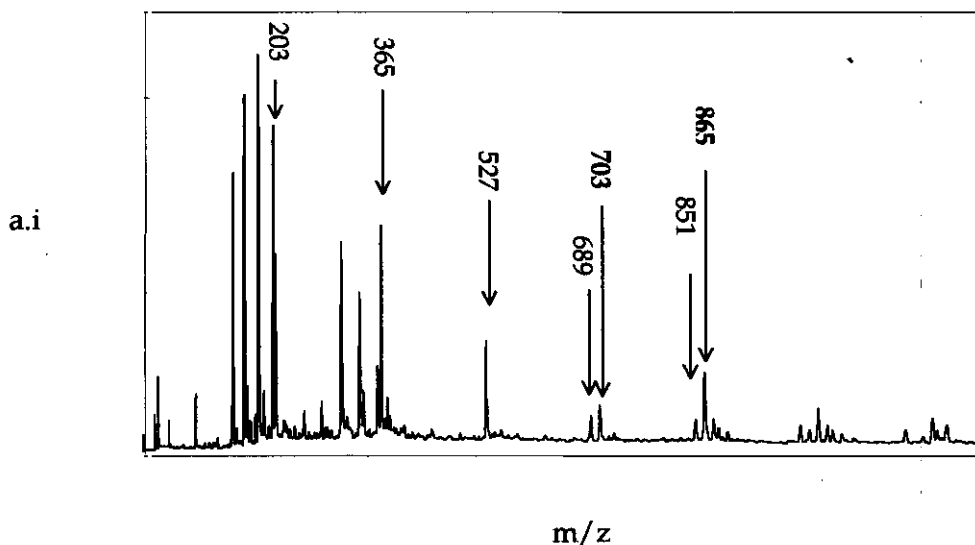


Figura 14. Espectro de MALDI-TOF de los oligosacáridos obtenidos por hidrólisis selectiva de los enlaces (1→6) del polisacárido F1Sg(3) PP de *P. furfuracea*. Los números en la figura señalan las masas correspondientes al ion $[M+Na]^+$ de varios oligosacáridos.

1.9. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Se registró el espectro de 1H -RMN de las fracciones purificadas en los apartados anteriores.

En la Figura 15, se representa el espectro del glucano soluble en agua fría purificado de la especie *P. furfuracea*. El glucano soluble extraído de *P. glauca* es similar y por ello no se incluye.

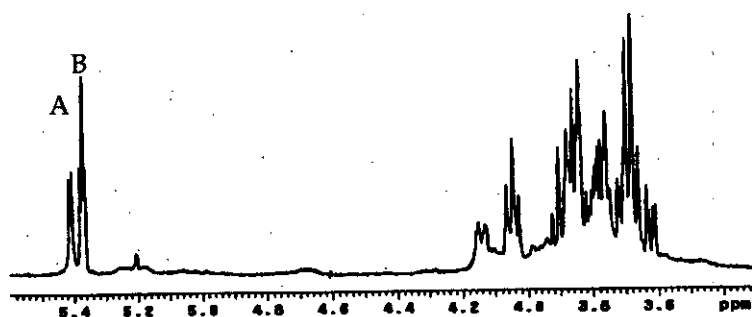


Figura 15. Espectro de ^1H -RMN de la fracción A2S SC de las especies *P. furfuracea* y *P. glauca*. Las letras corresponden a los residuos relacionados en la Tabla .

En la Figura 16 se representan los espectros de ^1H -RMN, de dos fracciones insolubles en agua fría pero que tras el tratamiento con sosa y diálisis se solubilizaron. Una vez liofilizadas resultaron de nuevo insolubles. En el caso de *P. glauca* las señales indican la existencia de glucosa (1 \rightarrow 3) y (1 \rightarrow 4) en configuración α . en el caso de caliente *P. furfuracea* se observan mezclas de señales α y β

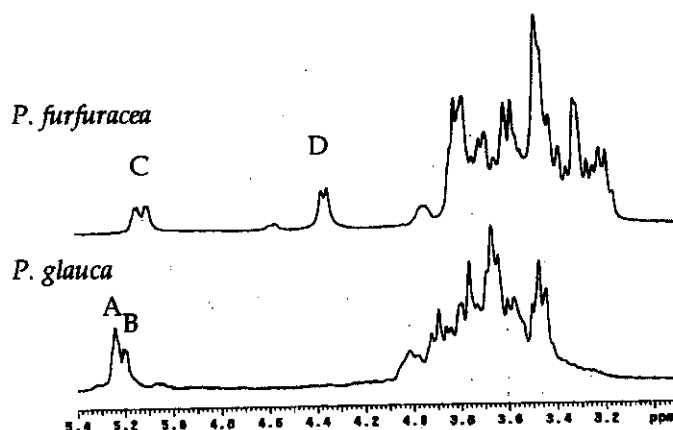


Figura 16. Espectros de las fracciones insolubles extraídas con agua caliente *P. furfuracea* y *P. glauca*: A2I b.

Los espectros de los galactomananos de las dos especies se muestra en la Figura 17.

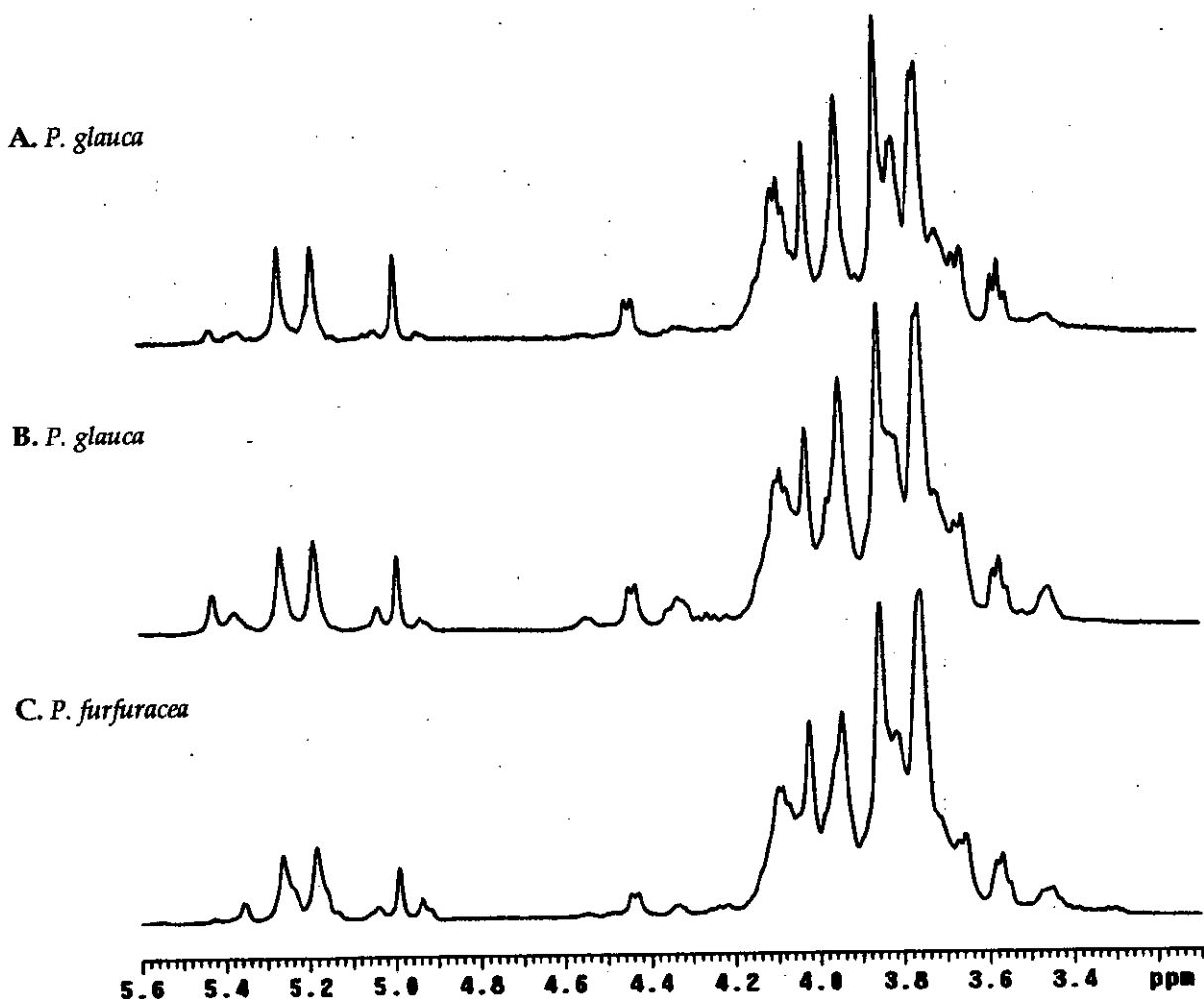


Figura 17. Espectros de ^1H RMN de las fracciones (A) F1Sg(1) PP y (B) F1Sg(3) PP de la especie *P. glauca*. Espectro de la fracción (C) F1Sg(3) PP de la especie *P. furfuracea*.

La similitud entre los espectros es grande, pero en parte es debido a que algunas de las señales de los carbonos anoméricos se juntan en un solo pico. Se observa que el espectro más sencillo es el primero, (A) F1Sg(1) PP de *P. glauca*, mientras que en los demás aparecen más señales.

Al tener a. glucurónico, el polisacárido se redujo convirtiendo éstos en glucosa deuterada. El espectro de este polisacárido se representa en la Figura 18.

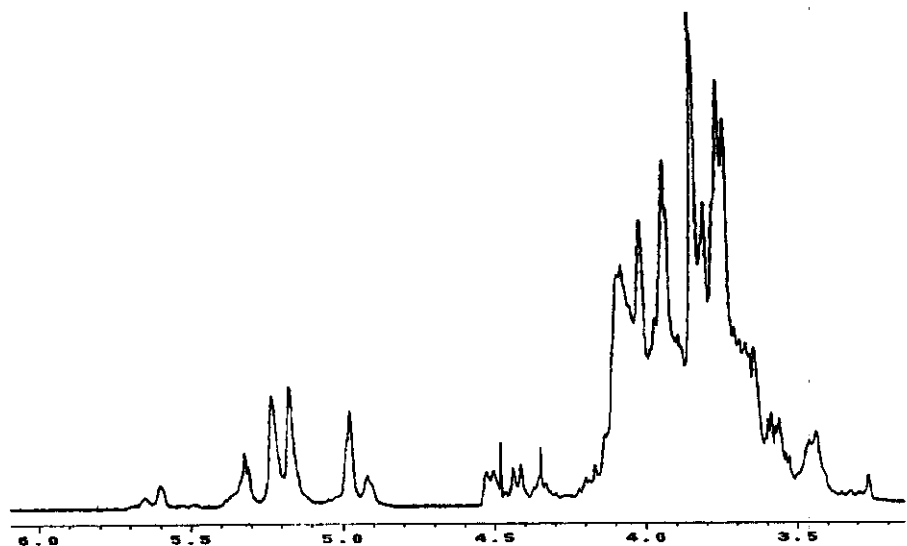


Figura 18. Espectro de ^1H RMN de la fracción reducida F1Sg(3) PP de la especie *P. furfuracea*.

1.10.Oxidación con peryodato y degradación de Smith de las fracciones insolubles en agua

Como se observa en la Figura 16, las fracciones A2I consumieron menor cantidad de peryodato que las fracciones F1I. Esto puede indicar que la fracciones A2I contienen una mayor proporción de enlaces (1-3), ya que este tipo de enlace no se oxida mediante el tratamiento con peryodato.

Los monosacáridos detectados tras la degradación de Smith de los polisacáridos oxidados (Tabla 6) indicaron que ambas fracciones presentaban estructuras diferentes.

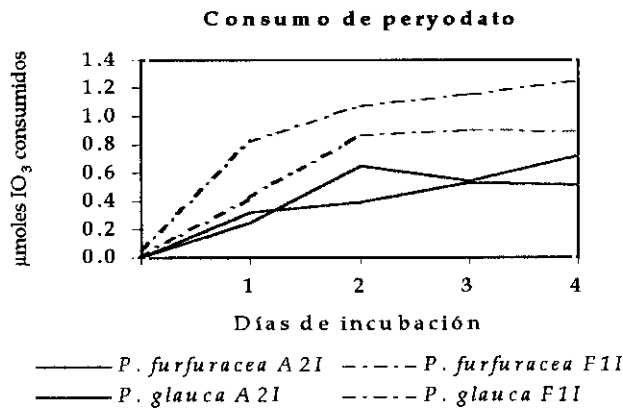


Figura 19. Consumo de peryodato por las distintas fracciones.

Monosacárido	<i>P. furfuracea</i>		<i>P. glauca</i>	
	A2I	F1I	A2I	F1I
glicerol	3	10	2	13
eritritol	19	4	28	4
treitol	1	1		
manosa	3	7		8
glucosa	31	19	27	18
Total:	57	41	57	43

Tabla 8. Monosacáridos, detectados por CGL como acetatos de alditol, liberados tras la degradación de Smith de las fracciones A2I y F1I oxidadas.

1.11. Purificación y análisis de las fracciones insolubles en agua (A2I y F1I)

Resuspendiendo la fracción en sosa y volviendo a dializar (como se describe en el apartado 2.6 de Material y Métodos) se separaron varias fracciones:

- un residuo insoluble en álcali (A2I a, F1I a)
- otra que se hizo soluble en sosa y que al dializar 3 días frente a agua se mantuvo soluble (A2I b F1I b)
- y por último, otra que precipitó en dicha diálisis (A2I c, F1I c).

Los porcentajes de estas se muestran en la Tabla 9. Se analizaron por espectroscopía de infrarrojos (Figuras 17 A y B) y metilación (Tabla 10).

ESPECIE	A2I b	A2I c	F1I a	F1I b	F1I c
<i>P. furfuracea</i>	24	55	69	12	4
<i>P. glauca</i>	74	10	66	21	3

Tabla 9. Porcentajes de fracciones respecto a las iniciales A2I y F1I.

En la fracción A2I, aunque se resuspendió bien en sosa sin dejar residuo, los porcentajes de las fracciones y los porcentajes de los tipos de enlace obtenidos por metilación fueron distintos para cada especie:

- En *P. furfuracea* el polisacárido A2I c fue mayoritario y los análisis de metilación fueron muy similar a A2I b, aunque este último tenía contaminación con un manano (Figura 20 A, Tabla 9). Los espectros de masas e infrarrojos de A2I c revelaron que se trataba de un β glucano con uniones

(1→3) y (1→4) en proporciones 1:1,7 que corresponde a lo descrito para el liquenano, excepto en una pequeña banda a 840-860 cm⁻¹.

- En *P. glauca* la fracción A2I *b* fue mayoritaria y aunque no precipitó al dializar frente a agua, después de liofilizar no fue soluble, volviendo así a su comportamiento original. Las proporciones de los enlaces (1→3) y (1→4) fueron 1:2,3 y el espectro fue similar al de los α glucanos (Figura 20 A, Tabla 9). La fracción A2I *c* se mostró algo diferente, siendo su espectro de infrarrojos similar al de los β glucanos y como en el caso anterior, también se observó una banda a 840-860 cm⁻¹. Las razones de enlaces de glucosa (1→3) y (1→4) fueron diferentes a las de *Pseudevernia* (2:1).

<i>Pseudevernia furfuracea</i>					
Tipo de enlace	A2I <i>b</i>	A2I <i>c</i>	FII <i>a</i>	FII <i>b</i>	FII <i>c</i>
Galp-(1→	trazas	-	20	8	-
→3)-Glc-(1→	42	36	55	34	37
→4)-Glc-(1→	51	64	5	56	63
→3,6)-Glc-(1→	-	-	3	-	-
→6)-Manp-(1→	trazas	-	17	2	-

<i>Platismatia glauca</i>					
Tipo de enlace	A2I <i>b</i>	A2I <i>c</i>	FII <i>a</i>	FII <i>b</i>	FII <i>c</i>
Galp-(1→	-	5	18	-	-
→3)-Glc-(1→	26	62	28	46	55
→4)-Glc-(1→	74	32	3	51	30
→3,6)-Glc-(1→	-	-	-	1	6
Hexp-(1→	-	-	-	2	6
→6)-Manp-(1→	-	1	37	-	1
→2,4,6)-Manp-(1→	-	-	14	-	-

Tabla 9. Porcentajes de los tipos de enlace deducidos tras el análisis de metilación de las fracciones insolubles.

El comportamiento de la fracción FII fue semejante en las dos especies. Gran proporción de dicha fracción no se suspendió en álcali (FII *a*) y probablemente contenía una mezcla de polisacáridos. La parte que si lo hizo, al dializar frente a agua

en su mayoría se mantuvo soluble (F1I b) y después de determinar los tipos de enlaces mediante metilación y el tipo de configuración por espectroscopía de infrarrojos se dedujo que se trataba de un glucano con enlaces β (1 \rightarrow 3) y (1 \rightarrow 4) en proporción 1:1,1 para *P. furfuracea* y 1:1,6 para *P. glauca*. La parte minoritaria que precipitó al dializar (F1I c) mostró una razón de enlaces de glucosa (1 \rightarrow 3) y (1 \rightarrow 4) de 1:1,5. La banda a 874 cm^{-1} en el espectro de infrarrojos se debe a una contaminación de carbonato (Figura 20 B).

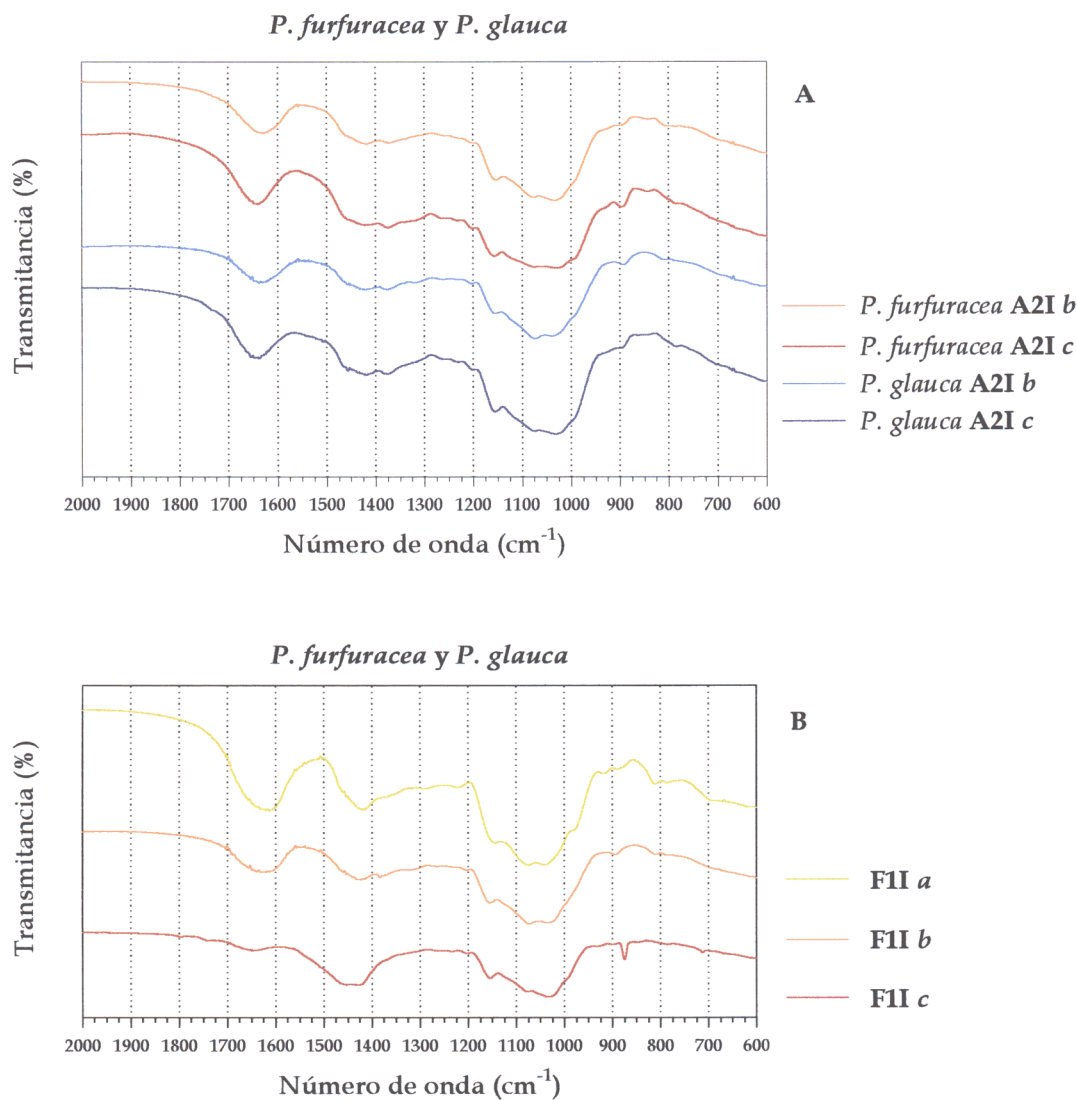


Figura 20. Espectros de infrarrojos de las fracciones insolubles en agua fría. A: Fracción extraída con agua. B: Fracción extraída con álcali.

2 FAMILIA UMBILICARIACEAE.

2.1. Resultados de la fraccionación

Las fracciones mayoritarias obtenidas de dos especies de *Lasallia* y dos de *Umbilicaria* fueron las insolubles A2I, F1I y F2 (Figura 21), mientras que las solubles representaron siempre cantidades menores del 5%.

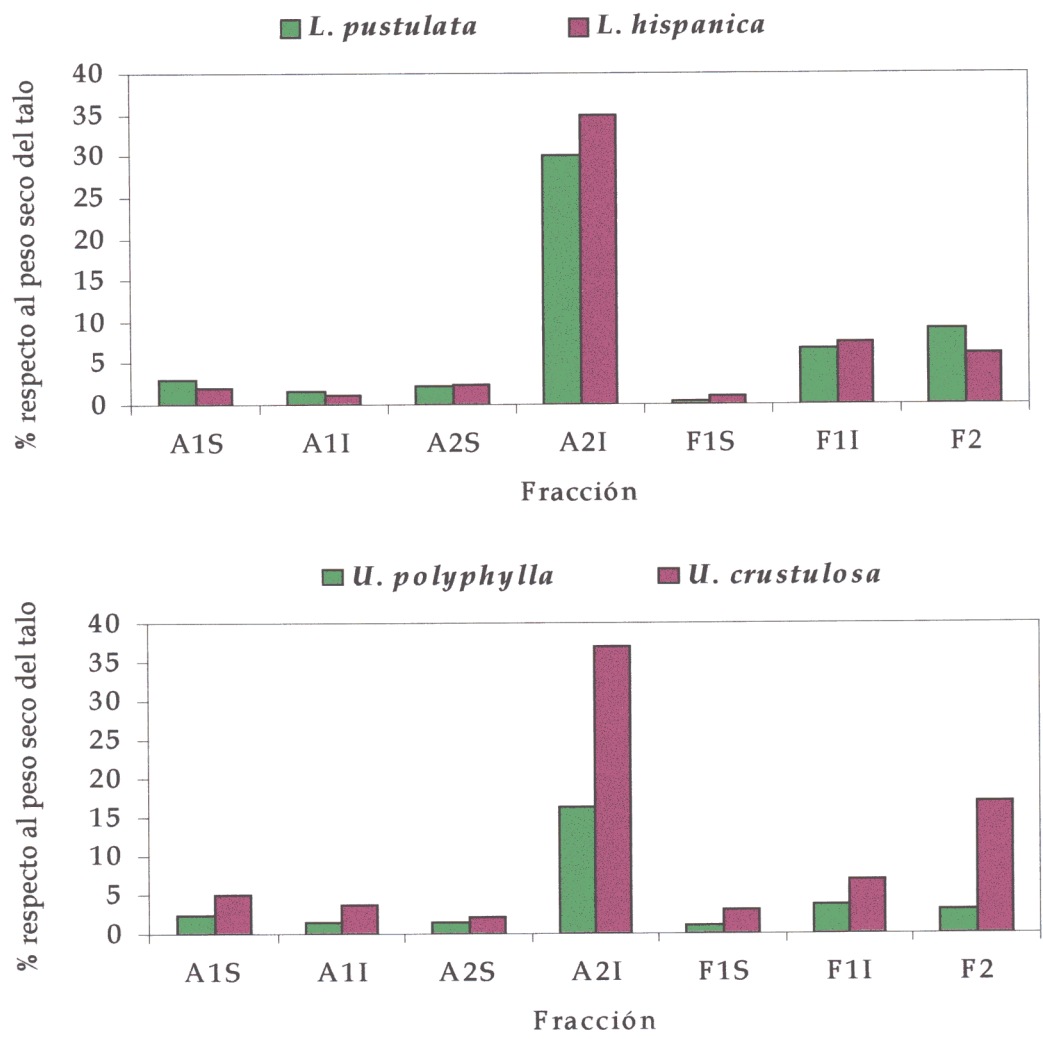


Figura 21. Porcentajes de las fracciones extraídas respecto a gramo de talo seco.

2.2. Análisis preliminar de las fracciones extraídas con agua (A2 y A1)

Las diferentes fracciones extraídas con agua se analizaron en primer lugar mediante espectroscopía de infrarrojos, determinando a continuación su composición en azúcares neutros por cromatografía de gases (Tablas 10 y 11).

Los espectros de infrarrojos de las fracciones A1S revelaron la presencia de proteína y/o aminoazúcares (bandas a 1560 y 1650 cm^{-1}). La determinación colorimétrica de proteínas (Bradford, 1959) dio diferentes porcentajes, según las especies: *L. pustulata* 14%, *L. hispanica*: 13%, *U. crustulosa*: 20%, *U. polyphylla*: 7%.

Los espectros de infrarrojos de las fracciones A2S mostraron bandas a 810, 915, 1170 y 1730 cm^{-1} .

Las fracciones solubles, A1S y A2S, contenían manosa, galactosa y glucosa.

Los espectros de IR de las fracciones A1I, en las 4 especies estudiadas, mostraron bandas específicas de lípidos (1740, 2850 y 2920 cm^{-1}). Asimismo, estas fracciones contenían menor cantidad de azúcares neutros, siendo destacable el caso de *L. pustulata*, que debe estar compuesta básicamente por lípidos. En las otras especies de esta familia, el componente glucídico de la fracción es un glucano.

Los espectros de las fracciones A2I mostraron bandas a 915 y 1170 cm^{-1} características de β -(1 \rightarrow 6) glucanos. Además, la existencia de una banda a 1730 cm^{-1} indicaba la presencia de enlaces éster en el polisacárido, que pueden proceder de grupos carboxílicos (por ejemplo de ácidos urónicos) o de otros sustituyentes, como acetato. Tras la hidrólisis de estas fracciones se detectó mayoritariamente glucosa (81-99%).

2.3. Análisis preliminar de las fracciones extraídas con NaOH (F1)

La fracción extraída con álcali y soluble en agua (F1S), presentaba coloración oscura debido a la presencia de pigmentos en todas las especies estudiadas. En los espectros de IR, mostró bandas características de galactomananos a 810, 880 y 915 cm^{-1} . El pigmento no modificó el espectro típico de un polisacárido, no observándose, en el intervalo medido, bandas adicionales a las citadas. El análisis cromatográfico de los productos de hidrólisis de este material demostró que estaba compuesto principalmente por manosa, galactosa y glucosa, en orden decreciente de abundancia (Tablas 10 y 11). En *U. polyphylla* y *U. crustulosa* se detectaron además pequeñas cantidades de ramnosa y xilosa.

Monosacárido	<i>L. pustulata</i>					
	A1S	A1I	A2S	A2I	F1S	F1I
arabinosa	4	-	-	-	-	-
manosa	2	1	7	3	52	13
galactosa	2	-	5	2	18	6
glucosa	9	1	80	86	6	59
Total:	16	2	91	90	76	78

Monosacárido	<i>L. hispanica</i>					
	A1S	A1I	A2S	A2I	F1S	F1I
ramnosa	3	-	-	-	-	-
arabinosa	-	1	-	-	-	-
manosa	15	3	11	3	51	15
galactosa	11	2	4	1	19	8
glucosa	38	49	75	89	6	42
Total:	66	54	91	93	75	64

Tabla 10. Porcentajes de los monosacáridos obtenidos tras hidrólisis de varias fracciones de especies de *Lasallia*, determinados mediante cromatografía de gases como acetatos de alditol.

Monosacárido	<i>U. polyphylla</i>					
	A1S	A1I	A2S	A2I	F1S	F1I
xilosa	1	-	-	-	5	1
ramnosa	3	-	-	-	9	2
arabinosa	1	-	-	-	1	-
manosa	10	3	5	3	35	15
galactosa	12	1	-	-	29	12
glucosa	46	60	78	81	14	46
Total:	73	64	83	84	92	75

Monosacárido	<i>U. crustulosa</i>					
	A1S	A1I	A2S	A2I	F1S	F1I
xilosa	-	-	-	-	1	-
ramnosa	3	1	1	-	2	-
arabinosa	-	-	1	1	-	1
manosa	15	8	13	3	49	10
galactosa	9	3	7	-	22	6
glucosa	20	41	38	96	6	52
Total:	47	53	61	100	80	68

Tabla 11. Porcentajes de los monosacáridos obtenidos tras hidrólisis de varias fracciones de especies de *Umbilicaria*, determinados mediante cromatografía de gases como acetatos de alditol.

En el espectro de IR de las fracciones F1I se observaron bandas a 810, 865, 900, 1120 y 1370 cm^{-1} y sus principales componentes resultaron ser glucosa (59-46%), manosa (15-10%) y galactosa (6-12%) (Tablas 10 y 11).

2.4. Análisis de la fracción F2

Las fracciones F2, que fueron el residuo que quedó tras las extracciones acuosas y alcalinas, mostró en el espectro de IR las bandas a 1550 y 1650 cm^{-1} características de los grupos CO-NH presentes en las proteínas y en los aminoazúcares, además de otras bandas a 890, 1120 y 1370 cm^{-1} atribuibles a la presencia de β -(1 \rightarrow 3) glucanos.

En *L. hispanica*, *U. polyphylla* y *U. crustulosa*, el contenido en azúcares neutros de esta fracción fue muy bajo (menor del 23%), mientras que en *L. pustulata* la hidrólisis dio mejores rendimientos: 11% de manosa, 6% de galactosa y 51% de glucosa.

Al ser este residuo difícilmente hidrolizable y hallarse muy pigmentado se hidrolizó la fracción F2 con ácido y posteriormente el residuo insoluble se extrajo con NaOH (apartado 2.7. de Material y Métodos). Los porcentajes de las fracciones, respecto a la cantidad inicial de talo seco, fueron los siguientes:

	<i>U. crustulosa</i>	<i>U. polyphylla</i>	<i>L. pustulata</i>	<i>L. hispanica</i>
F2I	11	3	5	4
F2I b	2	1	2	2
F2I a	5	2	2	2

Tabla 12. Porcentajes de las distintas fracciones del residuo respecto a g de talo seco.

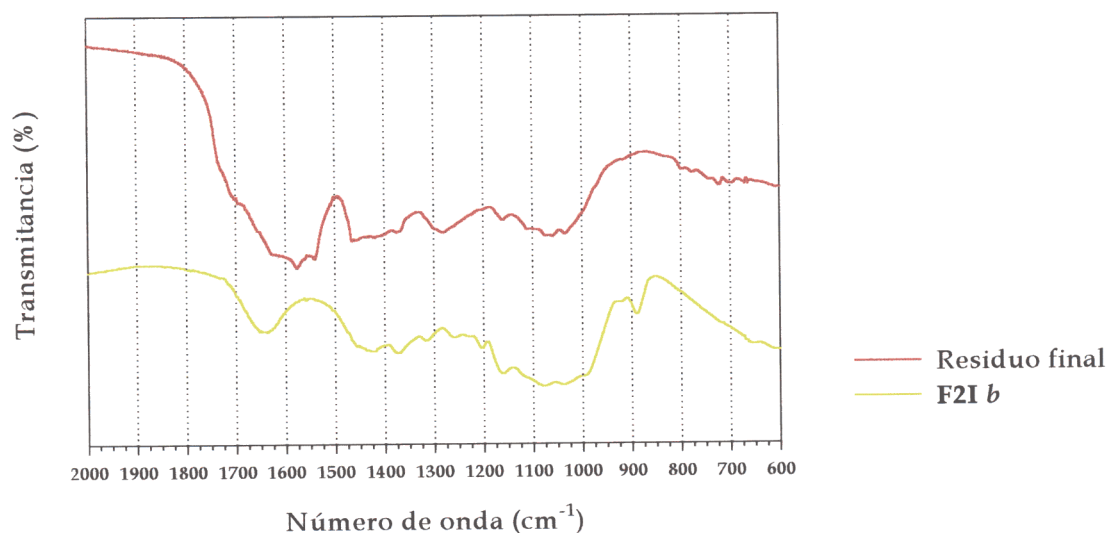


Figura 22. Espectros de infrarrojos de las fracciones finales de *L. pustulata*. glucano (F2I *b*) y el residuo final, pigmento tipo esporopolenina (F2I *aI*).

El espectro de infrarrojos y el análisis de monosacáridos demostraron que la fracción F2I *b* era un β -glucano (Figura 22).

Para determinar la presencia de aminoazúcares se escogió la especie *L. pustulata*. La fracción F2I *a* se lavó con metanol y NaOH 1M y se hidrolizó en dos condiciones diferentes. La determinación colorimétrica de aminoazúcares rindió porcentajes distintos para las dos hidrólisis ensayadas, siendo del 18% en la hidrólisis con HCl y del 28% en la hidrólisis con H₂SO₄.

La determinación por HPLC permitió identificar los aminoazúcares presentes como glucosamina.

El residuo final, se analizó mediante espectroscopía de IR (Figura 22) y en el análisis elemental se hallaron los siguientes porcentajes: 58,9% de Carbono, 6,4% de Hidrógeno, 2% de Nitrógeno y 32,6% de Oxígeno. De ellos se dedujo la fórmula:



2.5. Purificación de las fracciones solubles A1S, A2S y F1S.

2.5.1. Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones solubles

Las fracciones A1S, A2S y F1S se resuspendieron en un pequeño volumen de agua (2 ml) y se centrifugaron, reservando el sobrenadante.

Al resuspender en agua las fracciones A1S de las cuatro especies, se obtuvo una pequeña cantidad (menor del 5%) de un residuo insoluble (A1S I) compuesto de glucosa principalmente.

También se observó un comportamiento característico y similar en las 4 especies al resuspender en agua la fracción A2S. El residuo A2S I, constituyó algo más de la tercera parte de la fracción original y en el caso de *L. hispanica* representó la mitad. El componente principal fue glucosa (Tablas 13 y 14). El espectro IR de las fracciones A2S I mostró bandas a 915 y 1170 cm^{-1} características de β -(1 \rightarrow 6) glucanos. Además, la existencia de una banda a 1730 cm^{-1} indicaba la presencia de grupos acetilo en el polisacárido.

Cuando se resuspendió en agua la fracción F1S se obtuvo un residuo minoritario, F1S I (3-11% de la fracción original) en cuya composición monosacáridica, la glucosa era el monómero más abundante (Tablas 13 y 14)

El material que permaneció soluble después de centrifugar las tres fracciones (A1S, A2S y F1S) se cargó en una columna con un gel de Sepharose CL 6B para su análisis mediante cromatografía de exclusión molecular.

Se recogieron fracciones de 4 ml y, en cada pico detectado mediante el método colorimétrico del fenol-sulfúrico, se hicieron lotes compuestos por el contenido de 5 tubos consecutivos, liofilizándolos. El material de cada uno de estos lotes se estudió por ^1H -RMN comprobándose que el espectro no era igual en diferentes lotes de un mismo pico cromatográfico. Esto significaba que había una mezcla de polisacáridos en estas fracciones que no se podía separar con el gel de Sepharose CL 6B.

2.5.2. Tratamiento con reactivo de Fehling. Determinación de monosacáridos neutros.

Como las tres fracciones solubles contenían mucha manosa (Tablas 10 y 11), se decidió tratarlas con solución de Fehling, que precipita preferentemente mananos con uniones (1→6), separándolos así de otros polisacáridos que quedan en solución tras el tratamiento.

En el caso de A1S, la mayor parte del material quedó en solución (A1S SC) y al analizar la composición monosacarídica de este material que no precipitó se observó que se había enriquecido en manosa y galactosa y que además contenía pequeñas cantidades de otros componentes, entre los que podemos destacar la ramnosa (8% en *L. pustulata* y 11% en *L. hispanica*) (Tablas 13 y 14). En el espectro de infrarrojos de esta fracción en todas las especies, se observaron bandas a 810 y 870 cm^{-1} características de β -galactofuranosa.

El material precipitado con la solución de cobre (A1S PC, 1% del total en todas excepto en *U. crustulosa* que resultó el 4% del total) estaba compuesto por glucosa (49-53%) y manosa (13-20%) y en su espectro de IR se observaron bandas a 820, 915 y 1170 cm^{-1} que podían indicar la presencia de un β -glucano. La existencia de manosa y galactosa en esta fracción podría ser un indicio de que mediante el tratamiento con licor de Fehling precipitaban juntos un manano (1→6) y un β -(1→6)-glucano.

Al tratar la fracción A2S con solución de Fehling, el material sobrenadante (A2S SC) fue menor que el precipitado (menor del 1% del total) y en su espectro de IR también se detectaron bandas a 820 y 915 cm^{-1} , al igual que en A1S PC. En casi todas las fracciones A2S SC de especies de esta familia, el contenido en glucosa fue superior al de manosa, excepto en *U. crustulosa* (Tablas 13 y 14).

El material precipitado con reactivo de cobre (A2S PC aproximadamente un 1%) resultó ser, en proporción y composición, semejante a A2S I y A2I (Tablas 13 y 14). Se podría decir que no se trata de dos fracciones diferentes, sino del mismo material que se puede purificar a partir de la fracción original A2S por cualquiera de los dos procedimientos. El espectro de IR de las fracciones A2S

PC fue muy similar al de la fracción A2S I, previamente descrito, con bandas a 915 y 1170 cm^{-1} características de β -(1 \rightarrow 6) glucanos y la banda a 1730 cm^{-1} que podía indicar la presencia de grupos acetilo. Por cromatografía de gases (apartado 3.10. de Material y Métodos), se detectó un 15% de acetato en esta fracción. En la Figura 23 se puede observar el espectro de infrarrojos del polisacárido antes y después de desacetilar.

La fracción F1S estaba compuesta principalmente por manosa y galactosa (Tablas 10 y 11). Al realizar el tratamiento con licor de Fehling sólo se obtuvo precipitado en el caso de *L. pustulata*, mostrando el precipitado (F1S PC) mayor porcentaje de manosa que el material que no precipitó con el tratamiento (F1S SC) (Tablas 13 y 14). En el espectro de IR, la fracción F1S PC se diferenció de F1S SC por la presencia de una banda a 880 cm^{-1} en lugar de a 860 cm^{-1} .

Monosacárido	<i>L. pustulata</i>							
	A1S SC	A1S PC	A2S SC	A2S PC	A2S I	F1S SC	F1S PC	F1S I
xilosa	5	-	-	-	-			
ramnosa	8	2	-	-	-			
arabinosa	3	3	-	-	-			
manosa	24	13	28	7	6	50	70	10
galactosa	25	7	13	1	2	24	11	5
glucosa	5	53	59	89	61	5	6	25
Total:	69	78	99	97	69	79	87	40

Monosacárido	<i>L. hispanica</i>							
	A1S SC	A1S PC	A2S SC	A2S PC	A2S I	F1S SC	F1S PC	F1S I
xilosa	4	-	1	-	-	-	-	-
ramnosa	11	2	2	-	-	-	-	-
arabinosa	4	3	2	-	2	-	-	-
manosa	30	20	24	11	9	51	-	-
galactosa	33	8	9	4		19	-	-
glucosa	6	49	38	75	86	6	-	-
Total:	88	81	71	91	96	75	-	-

Tabla 12. Porcentajes de los monosacáridos obtenidos tras hidrólisis de varias fracciones de especies de *Lasallia*, determinados mediante cromatografía de gases como acetatos de alditol.

Monosacárido	U. polyphylla							
	A1S SC	A1S PC	A2S SC	A2S PC	A2S I	F1S SC	F1S PC	F1S I
xilosa	4	-	3	-	-	5	-	2
ramnosa	9	6	4	-	-	9	-	3
arabinosa	3	-	2	-	-	1	-	-
manosa	22	7	23	2	3	35	-	14
galactosa	31	8	15	-	-	29	-	12
glucosa	5	61	41	70	70	14	-	43
Total:	74	81	86	72	73	92	-	74

Monosacárido	U. crustulosa							
	A1S SC	A1S PC	A2S SC	A2S PC	A2S I	F1S SC	F1S PC	F1S I
xilosa	1	-	2	1	-	1	-	-
ramnosa	6	2	3	-	3	2	-	-
arabinosa	1	-	2	3	2	-	-	-
manosa	36	17	33	24	20	49	-	21
galactosa	26	9	17	8	5	22	-	12
glucosa	5	32	10	35	66	6	-	32
Total:	75	60	66	70	96	80	-	65

Tabla 13. Porcentajes de los monosacáridos obtenidos tras hidrólisis de varias fracciones de especies de *Umbilicaria*, determinados mediante cromatografía de gases como acetatos de alditol.

Las fracciones F1S SC y F1S PC fueron resuspendidas en agua y filtradas a través de una columna con Sepharose CL 6B. Las muestras eluyeron en un único pico, pero el análisis por ¹H-RMN de distintas fracciones dentro de ese pico puso de manifiesto que su composición era heterogénea, indicando la presencia de más de un polisacárido. Las fracciones eluidas de la columna tras la filtración de ambas muestras siguieron presentando pigmentación marrón oscura. Por tanto, este método de purificación demostró no ser de utilidad en este caso, ya que no logró separar ni la mezcla de polisacáridos de dichas fracciones ni el pigmento que contenían.

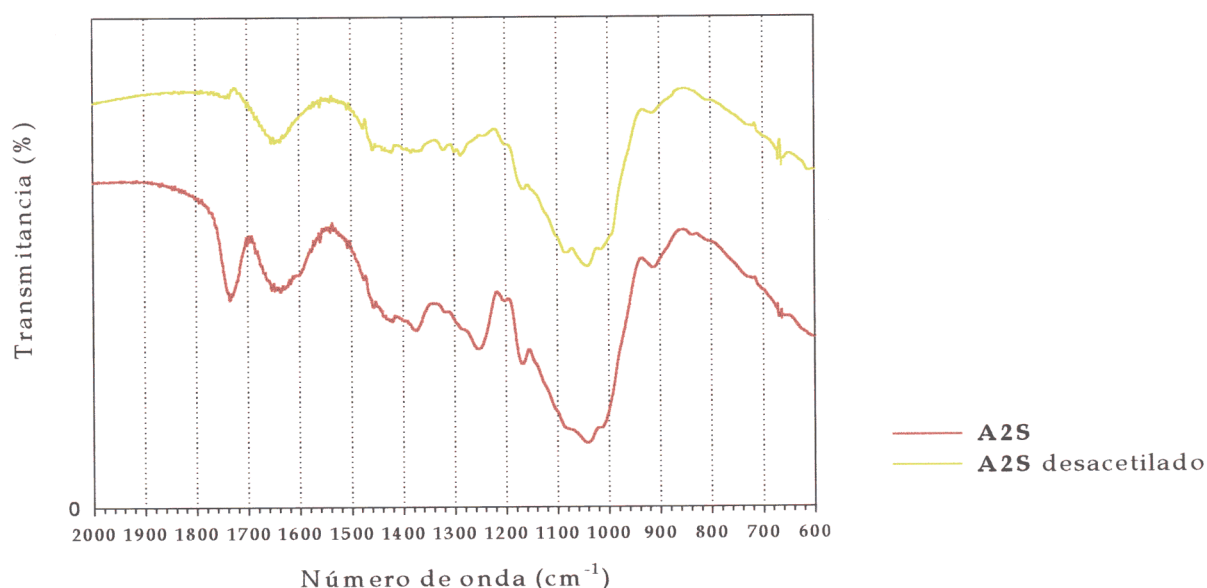


Figura 23. Espectros de infrarrojos del glucano acetilado (A2S) y desacetilado (A2S desacetilado).

2.5.3. Cromatografía de intercambio iónico de la fracción F1S

En la Figura 24 y se muestran los perfiles de elución de las fracciones F1S de las 4 especies, analizadas mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharose CL 6B. Se obtuvieron dos fracciones, denominadas respectivamente F1Sn y F1Sg. El espectro de ^1H -RMN de ambas fracciones fue muy similar. El pigmento negro que contenía la fracción F1S quedó fuertemente retenido en la columna, fue eluído lavando la columna con NaOH y finalmente se desechó. La determinación de ácidos urónicos mediante el método del carbazol en la fracción F1Sg dio resultados negativos.

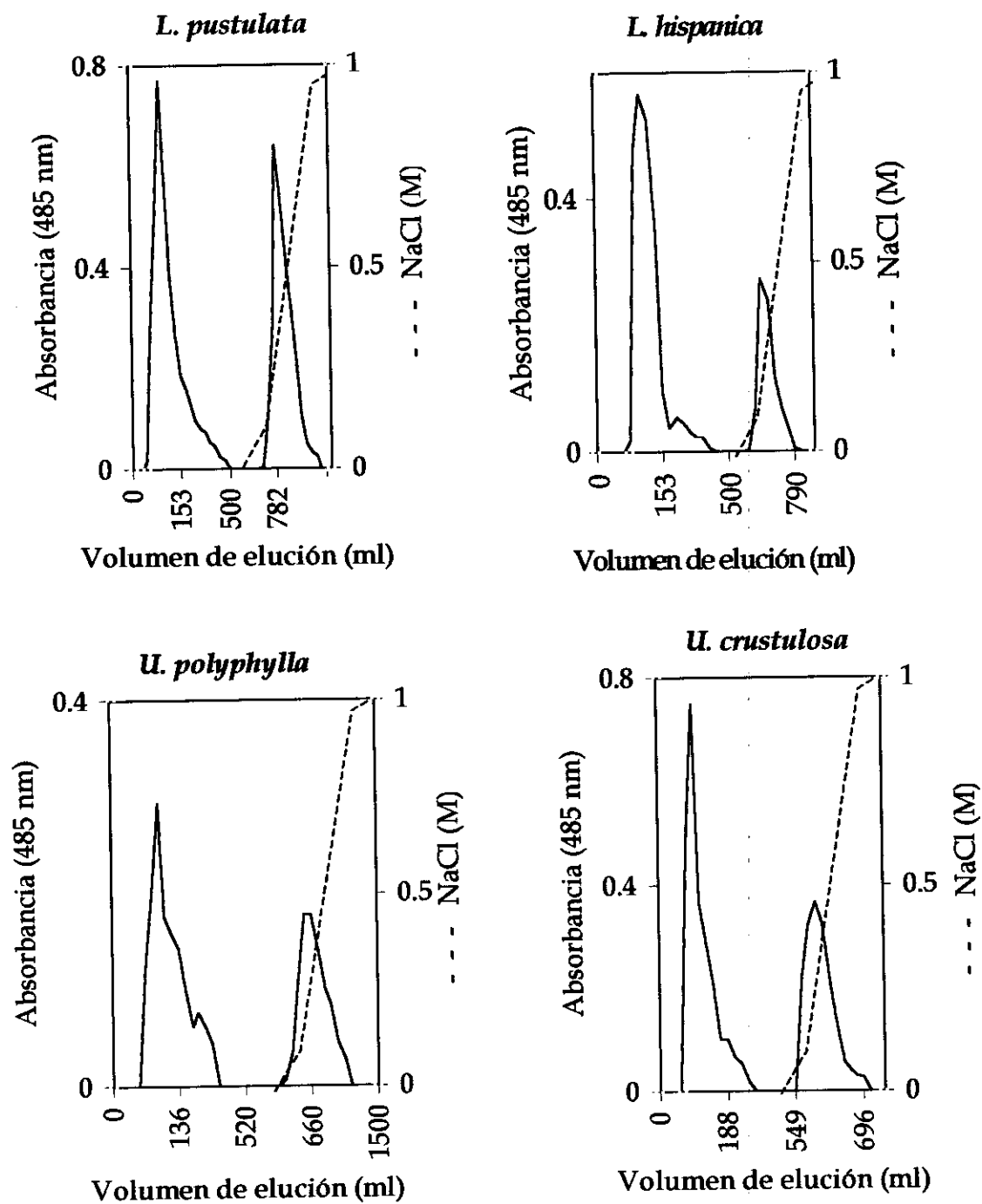


Figura 24. Análisis de la fracción F1S mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharose CL 6B. La línea discontinua indica la evolución del gradiente de NaCl.

2.5.4. Precipitación con 2-propanol

Para comprobar si las fracciones F1Sn y F1Sg estaban compuestas por un solo polisacárido o por una mezcla, se trataron ambas con isopropanol (apartado 2.4.2. de Material y Métodos). En todos los casos se separó un material que precipitaba al añadir el 2-propanol de otro producto que permanecía soluble. En la Tabla 15 se muestran los porcentajes que representan cada una de estas fracciones respecto al peso seco de la fracción F1S.

<i>L. pustulata</i>		
	F1Sn	F1Sg
sobrenadante	19	21
precipitado	15	16

<i>L. hispanica</i>		
	F1Sn	F1Sg
sobrenadante	9	27
precipitado	15	21

<i>U. polyphylla</i>		
	F1Sn	F1Sg
sobrenadante	44	18
precipitado	11	3

<i>U. crustulosa</i>		
	F1Sn	F1Sg
sobrenadante	46	15
precipitado	10	10

Tabla 13. Porcentajes (con respecto a la fracción inicial F1S) del material obtenido tras tratar con 2-propanol las fracciones F1Sn y F1Sg. El porcentaje restante hasta llegar a 100 corresponde al residuo F1S I.

2.6. Metilación y análisis de las fracciones purificadas mediante tratamiento con isopropanol.

Los tipos de enlace de estas fracciones se determinaron mediante análisis de metilación y de rotura reductora (Tablas 16 y 17). Se pudo observar que las fracciones que no precipitaban con isopropanol (F1Sn SP y F1Sg SP) se parecían mucho entre sí. Todos ellos eran manogalactanos, caracterizados por su alto grado de ramificación, con una elevada proporción de residuos terminales de galactofuranosa (30-54%) y menor cantidad de residuos terminales de manopiranososa (6-20%).

Los polisacáridos precipitados con isopropanol (F1Sn PP y F1Sg PP) eran también muy semejantes entre sí. Todos eran galactomananos muy ramificados. En ellos se detectó mayor cantidad de manopiranososa terminal (34-45%) que de galactopiranososa terminal (10-26%).

2.7. Obtención y análisis del esqueleto de las fracciones F1Sn

En vista de la similitud entre las fracciones F1Sn y F1Sg, se eligió una sola de ellas, F1Sn, para realizar otros análisis encaminados a intentar esclarecer su estructura. Al ser polímeros muy ramificados, los resultados de la metilación y la rotura reductora de los polisacáridos F1Sn arrojaban un mal balance entre residuos terminales y puntos de ramificación (su proporción, teóricamente, debería ser 1:1), probablemente debido a deficiencias en la hidrólisis. Aprovechando que los residuos de galactofuranosa terminal eran muy abundantes en algunos casos, se planteó realizar una hidrólisis parcial que dejara al polisacárido sin una parte de las ramificaciones (apartado 3.3. de Material y Métodos), obteniéndose el "core" o esqueleto del polisacárido original. Los tipos de enlace de dichos esqueletos se detallan en la Tabla 18. Los esqueletos de las fracciones F1Sn SP de las cuatro especies estaban compuestos por los mismos tipos de residuos de manosa, pero en diferentes proporciones, siendo muy similares entre sí los de las dos especies de *Lasallia*.

Tipos de enlace	<i>L. pustulata</i>			
	F1Sn SP	F1Sn PP	F1Sg SP	F1Sg PP
Galp-(1→	-	-	-	1
Galf-(1→	49	19	48	8
→3-Galf-(1→	6	2	4	trazas
→5-Galf-(1→	trazas	11	11	-
→3-Galp-(1→	-	1	-	trazas
→3)-Glcp-(1→	-	3	-	-
Manp-(1→	6	32	15	42
→2)-Manp-(1→	29	1	14	5
→3)-Manp-(1→		1	-	-
→6)-Manp-(1→	1?	25	2	20
→2,3)-Manp-(1→	1	-	-	-
→2,6)-Manp-(1→	7	17	6	26
→4,6)-Manp-(1→	-	2	-	1
→2,4,6)-Manp-(1→	-	2	-	2
→2)-Ramnp-(1→	1	-	-	-
Xilp-(1→	1	-	-	-
→4)-Xilp-(1→	-	-	-	trazas

Tipos de enlace	<i>L. hispanica</i>			
	F1Sn SP	F1Sn PP	F1Sg SP	F1Sg PP
Galf-(1→	49	22	30	20
→5-Galf-(1→	-	-	1	-
Manp-(1→	12	33	20	34
→2)-Manp-(1→	21	2	17	4
→3)-Manp-(1→	-	1	-	1
→6)-Manp-(1→	2	15	5	16
→2,3)-Manp-(1→	6	-	3	-
→2,6)-Manp-(1→	4	18	10	5
→3,6)-Manp-(1→	3	-	3	-
→4,6)-Manp-(1→	2	4	3	4
→2,4,6)-Manp-(1→	2	5	3	5

Tabla 16. Tipos de enlaces de las fracciones F1Sn y F1Sg, determinados mediante CGL-EM tras los análisis de metilación y rotura reductora. Los porcentajes fueron calculados atendiendo al área de los picos.

Tipos de enlace	U. polyphylla			
	F1Sn SP	F1Sn PP	F1Sg SP	F1Sg PP
Galf-(1→	47	18	54	22
→3-Galf-(1→	3	2	trazas	-
→5-Galf-(1→	trazas	trazas	5	-
Manp-(1→	14	40	15	36
→2)-Manp-(1→	11	4	12	6
→6)-Manp-(1→	2	17	2	16
→2,6)-Manp-(1→	4	14	4	13
→4,6)-Manp-(1→	10	3	5	3
→2,4,6)-Manp-(1→	8	3	4	4
→2)-Ramnp-(1→	1	-	-	-
→2,3)Ramnp-(1→	1	-	-	-
Xilp-(1→	-	-	-	-

Tipos de enlace	U. crustulosa			
	F1Sn SP	F1Sn PP	F1Sg SP	F1Sg PP
Galf-(1→	30	10	32	12
→3-Galf-(1→	3	-	-	-
→5-Galf-(1→	trazas	10	-	trazas
Manp-(1→	9	35	12	44
→2)-Manp-(1→	30	6	25	1
→6)-Manp-(1→	6	18	8	23
→2,6)-Manp-(1→	21	22	23	20
→2)-Ramnp-(1→	1	-	-	-
→2,3)Ramnp-(1→	1	-	-	-
Xilp-(1→	2	-	-	-

Tabla 17. Tipos de enlace de las fracciones F1Sn y F1Sg, determinados mediante CGL-EM tras los análisis de metilación y rotura reductora. Los porcentajes fueron calculados atendiendo al área de los picos.

Tipos de enlace	Esqueleto de F1Sn SP			
	<i>L. pustulata</i>	<i>L. hispanica</i>	<i>U. polyphylla</i>	<i>U. crustulosa</i>
Manp-(1→	13	7	23	37
→2)-Manp-(1→	56	69	9	15
→6)-Manp-(1→	16	18	45	12
→2,6)-Manp-(1→	15	6	20	32

Tipos de enlace	Esqueleto de F1Sn PP			
	<i>L. pustulata</i>	<i>L. hispanica</i>	<i>U. polyphylla</i>	<i>U. crustulosa</i>
Manp-(1→	27	22	23	23
→2)-Manp-(1→	10	11	10	7
→6)-Manp-(1→	37	44	40	49
→2,6)-Manp-(1→	25	22	26	21

Tabla 18. Tipos de enlace de los esqueletos de la fracción F1Sn.

2.8. Acetolisis de la fracción F1Sn SP de *L. pustulata*

La fracción F1Sn SP fue sometida a acetolisis (apartado 3.6. de Material y Métodos) con el fin de hidrolizar selectivamente los enlaces (1→6) del polisacárido, para obtener, entre otros oligosacáridos, las cadenas laterales que lo constituyen. Después de la acetolisis, se separaron mediante diálisis los oligosacáridos de Pm<3500 Da de otros de Pm>3500 Da. En la Figura 25 representamos el espectro de MALDI-TOF de los componentes de bajo Pm.

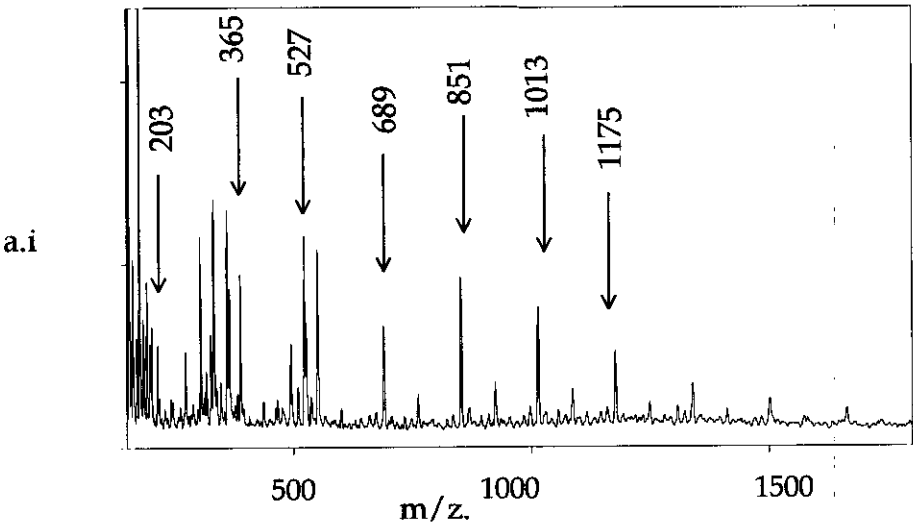


Figura 25. Oligosacáridos obtenidos por hidrólisis selectiva (acetolisis) del polisacárido F1Sn SP de *L. pustulata*.

No se detectaron componentes de peso molecular mayor de 1500 Da en el material que quedó fuera de la bolsa de diálisis. Las masas de los picos detectados mediante MALDI-TOF correspondieron a oligómeros de hexosas neutras que van desde el monosacárido ($n=1$) hasta el nonasacárido ($n=9$). La metilación de la fracción de peso molecular mayor de 3500 Da, retenida dentro de la membrana de diálisis, estaba compuesta de (1→2)-manosa y algo de (1→2,6)-manosa indicando que no todo el polisacárido pudo ser hidrolizado en el tiempo de acetólisis.

2.9. Espectroscopía de ^1H -RMN

El β -(1→6) glucano aislado resultó ser semejante en las cuatro especies de esta familia. En la Figura 26 se muestra su espectro característico.

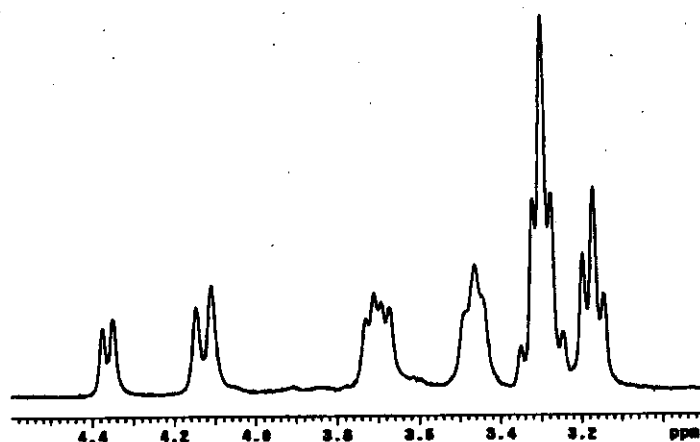


Figura 26. Espectro de ^1H -RMN del glucano insoluble (fracción A2I) de las cuatro especies estudiadas.

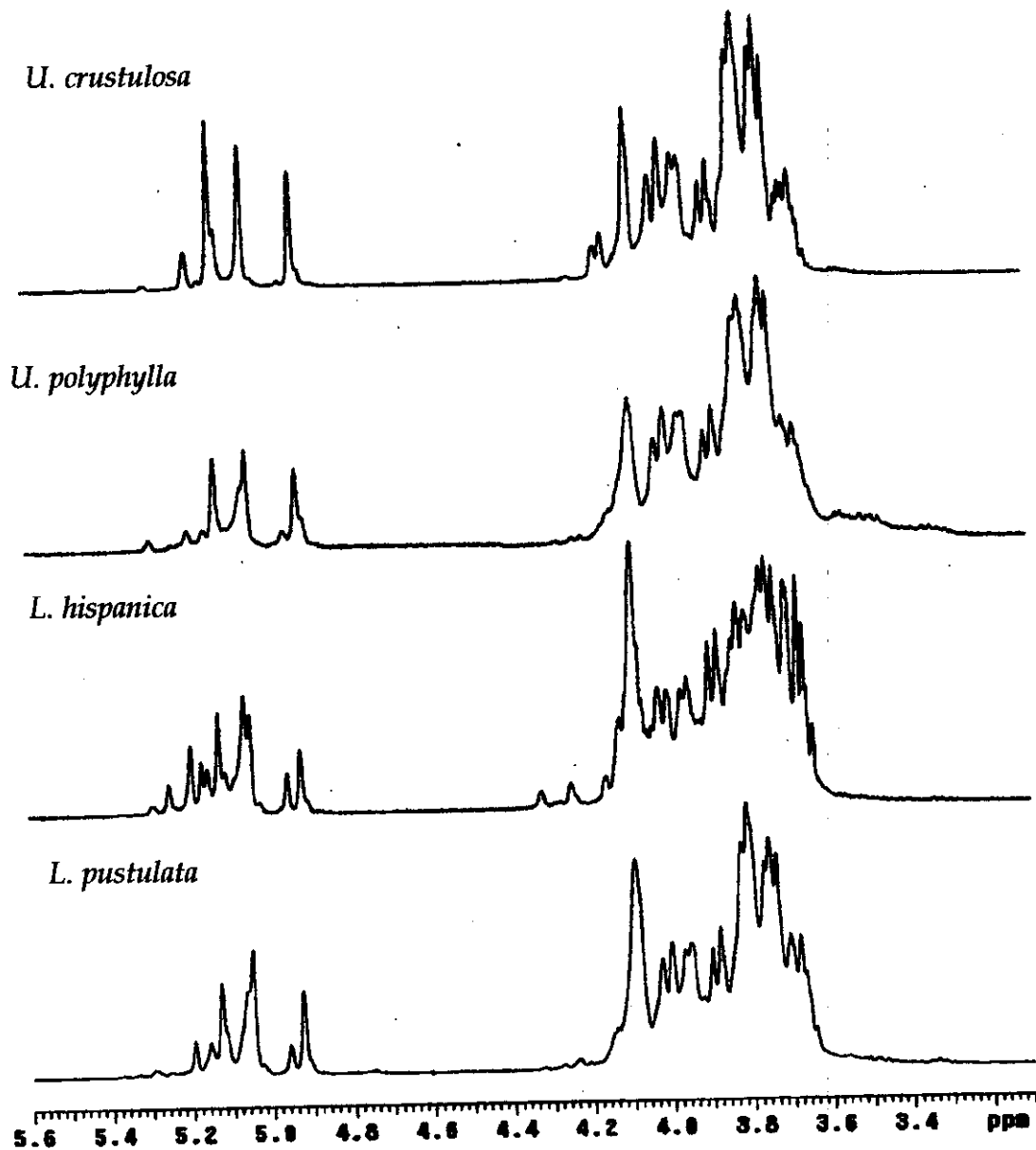


Figura 27. Espectros de ^1H -RMN de la fracción F1Sn PP de las cuatro especies estudiadas.

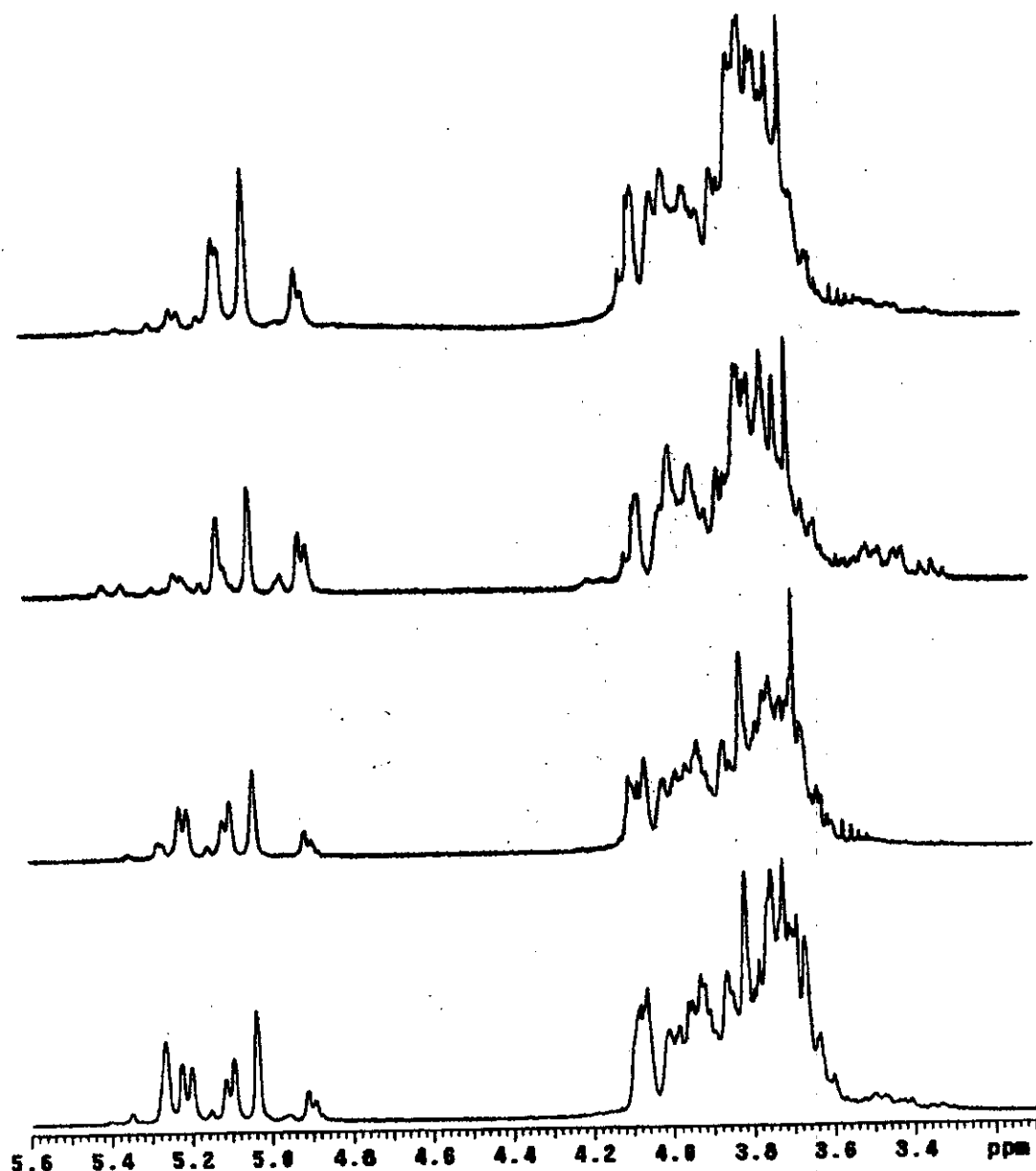


Figura 28. Espectros de ^1H -RMN de los esqueletos obtenidos por hidrólisis parcial de la fracción F1Sn SP de las cuatro especies estudiadas.

2.10. Oxidación con peryodato y degradación de Smith de las fracciones A2I y F1I

A los cuatro días de incubación se estabilizó el consumo de peryodato indicando que las fracciones A2I y F1I estaban totalmente oxidadas. El consumo fue menor en la oxidación de las fracciones F1I, lo que sugiere que

debe contener mayor proporción de enlaces (1→3), resistentes a la oxidación con peryodato.

El resultado de la degradación de Smith en las fracciones F1I de todas las especies se obtuvo principalmente glucosa junto con glicerol, manosa y arabinosa. La fracción A2I fue degradada por el peryodato casi completamente y se recuperó una cantidad muy pequeña de polisacárido oxidado, compuesto principalmente por glicerol y glucosa en proporción 1:5. Esto indicaría que la fracción está formada por enlaces (1→6) pero que contiene una pequeña proporción de glucosa (1→3).

2.11. Purificación y análisis de las fracciones insolubles A2I y F1I

El espectro de IR de las fracciones A2I mostró bandas a 915 y 1170 cm^{-1} características de β -(1→6) glucanos. Estas bandas se detectaron también en el espectro de IR de las fracciones A2S I y A2S PC. Además, la existencia de una banda a 1730 cm^{-1} indicaba la presencia de grupos ácidos o acetilo en el polisacárido. Probablemente estas tres fracciones correspondan al mismo polisacárido.

Mediante análisis de metilación se constató que la fracción A2I estaba constituida mayoritariamente por glucosa con uniones (1→6). También se detectó otro tipo de enlace de glucosa, (1→3) en proporciones pequeñas (<5%) y para comprobar si éstos formaban parte del glucano o de otro polisacárido minoritario, se intentó purificar el glucano mediante tratamiento con sosa (apartado 2.6. de Material y Métodos), obteniéndose dos productos A2I *b* y A2I *c*, uno de los cuales representaba tan solo entre un 2% y un 4% (Tabla 18).

El espectro de IR de la fracción soluble (A2I *b*), con bandas a 810 y 915 cm^{-1} , fue distinto al de la insoluble (A2I *c*). En el análisis de metilación de A2I *b* se detectaron dos tipos de enlace (1→6) y (1→3). Debido a la pequeña proporción que representaba, respecto al total, se descartó su análisis posterior.

Especie	A2I <i>b</i>	A2I <i>c</i>	FII <i>a</i>	FII <i>b</i>	FII <i>c</i>
<i>L. pustulata</i>	2	83	12	8	68
<i>L. hispanica</i>	4	78	8	10	66
<i>U. polyphylla</i>	4	83	12	13	64
<i>U. crustulosa</i>	4	76	-	17	73

Tabla 18: Porcentajes de las fracciones obtenidas respecto a las fracciones iniciales (A2I y FII), después del tratamiento con NaOH.

En el espectro de IR de la fracción A2I *c* (Figura 29 A) se apreció una banda a 915 cm^{-1} , característica de glucanos, y otra a 890 cm^{-1} , típica de anómeros en configuración β . El único componente detectado tras la metilación del polisacárido fue la 1,5,6-triacetil-2,3,4-tetrametil-glucosa, lo que indicaba que el polisacárido era un glucano con enlaces tipo β (1 \rightarrow 6). Los análisis de metilación y resonancia magnética nuclear (Figura 26) no mostraron diferencias en esta fracción en las cuatro especies estudiadas. Los grupos acetilo, que estaban presentes en la fracción inicial A2I, no se detectaron puesto que quedarían eliminados con el tratamiento con NaOH.

La fracción FII de las cuatro especies estaba constituida principalmente por (1 \rightarrow 3)-glucosa y (1 \rightarrow 6)-glucosa pero también se detectaron otros tipos de enlace en proporciones variables (5-20%). El tratamiento con NaOH permitió separar 3 fracciones, una de los cuales era mayoritaria (Tabla 18).

La fracción FII *a* estaba muy pigmentada y el rendimiento en carbohidratos fue bajo. El espectro de IR de FII *b* mostró bandas a 810 , 865 y 900 cm^{-1} (Figura 24 B). Los tipos de enlace mayoritarios, revelados por el análisis de metilación, fueron manosa terminal, galactofuranosa terminal, glucosa (1 \rightarrow 3), galactofuranosa (1 \rightarrow 5) manosa (1 \rightarrow 6) y (1 \rightarrow 2,6), confirmando la complejidad de la muestra. FII *c* fue la fracción mayoritaria, constituida por β (1 \rightarrow 6)-glucosa (18-25%) y β (1 \rightarrow 3)-glucosa (30-54%) excepto en *U. crustulosa* en la que sólo se obtuvo β (1 \rightarrow 3)-glucosa. Esto nos hizo pensar en la posibilidad de que en la fracción FII *c* existiera una mezcla de dos polisacáridos: un β (1 \rightarrow 3)-glucano y un β (1 \rightarrow 6)-glucano. Se eligió la fracción FII *c* de *L. pustulata* para comprobar esta hipótesis, tratando el material con agua a 100°C . Estos dos polisacáridos

simbiosis. Otras diferencias son que muestran tinción positiva con azul de Coomasie (proteínas), azul Alcian (polisacáridos ácidos), rojo de rutenio (polisacáridos ácidos), concanavalina A (residuos de glucosa o manosa) y autofluorescencia (Bubrick, 1988). Las propiedades inmunológicas se mostraron únicas para cada uno de los estados. Tanto en cultivo como en simbiosis es característica la presencia de almidón como material de reserva.

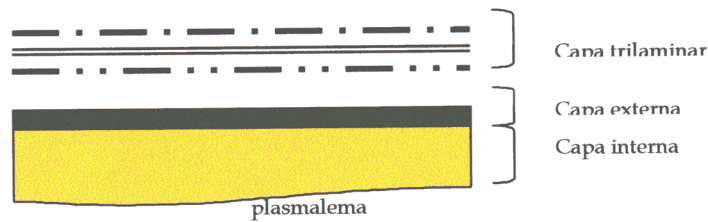


Figura 3. Esquema de la pared celular de *Myrmecia* y *Coccomyxa* (Modificado de Honegger y Brunner, 1981). Capa trilaminar: contiene partículas embebidas en una matriz de carbohidratos con una distribución aleatoria o no. En medio, una capa lisa contiene esporopolenina. La capa externa probablemente contiene fibras celulósicas embebidas en una matriz. La capa interna contiene heteropolisacáridos y tiene una estructura amorfa.

2.2. Pared celular del micobionte

El estudio de la pared de los hongos liquenizados es algo más complicado, por que su crecimiento en cultivo axénico es lento, además su aislamiento resulta complicado y no siempre es posible. Por otra parte, los trabajos que describen un polisacárido aislado de todo el líquen, no describen los componentes restantes, por lo que no se puede conocer la abundancia de éste en la pared.

La morfología externa del líquen es muy variable. Dependiendo de las especies podemos diferenciar talos crustáceos, foliáceos, fruticosos, etc. Esto se ve reflejado también en la morfología interna de las capas del talo y está directamente relacionado con la composición polisacarídica particular.

Centrándonos en el micobionte, uno de los pocos trabajos en que se define la estructura de la pared fue el de Boissière, de 1987. Propuso un modelo de pared celular para el micobionte de *Peltigera canina* y *Lassallia pustulata* en el que mediante extracciones diferenciales del talo liquénico, reconstruía la disposición de los polímeros en la pared (Figura 4).

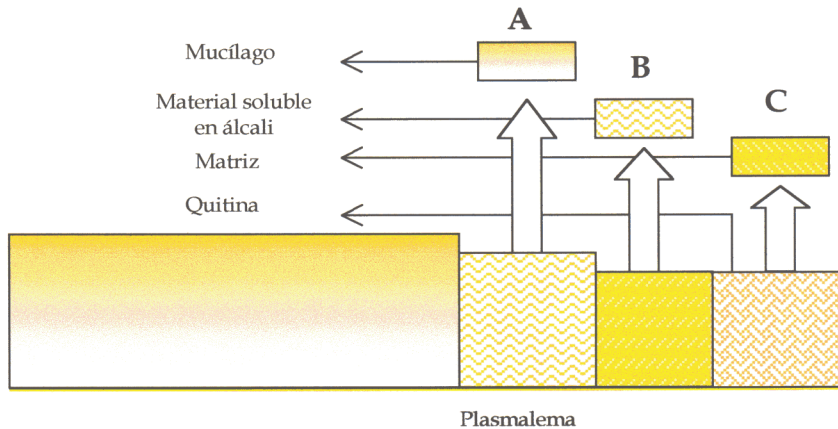


Figura 4. Esquema de distribución de los polisacáridos de *Peltigera canina* y *Lassallia pustulata* en la pared celular propuesto por Boissière (1987). A: extracción del talo con agua hirviendo. B: extracción con álcali diluido. C: extracción con ácido hirviendo. Los mucílago y el material soluble en álcali están compuestos de galactomananos y β -(1 \rightarrow 3) glucanos además de proteínas y glucosamina en *Peltigera*. La matriz es un β -(1 \rightarrow 6) y β -(1 \rightarrow 3) glucano.

Experimentos realizados con micobiontes aislados (Galun *et al.*, 1976) demostraron que eran capaces de incorporar N-(3 H)-acetilglucosamina a la pared y por tanto que la quitina es un componente esencial de la misma. Estudios posteriores de Honegger y Bartnicki-García (1991) demostraron que la pared celular de los micobiontes en cultivo axénico era similar a la de los demás Euascomycetes y que contiene un glucano mayoritario (probablemente un β -(1 \rightarrow 3)- β -(1 \rightarrow 6)) insoluble en álcali. Otros heteropolisacáridos solubles (7-10%) y la quitina (3-7%) constituían una fracción minoritaria. Además, contenían lípidos (10-3%) y proteínas (8-4%). La estructura de la pared de la hifa al microscopio electrónico de transmisión se reveló muy distinta a la que se observa en simbiosis ya que en las hifas de los cultivos sumergidos desaparecía una capa irregularmente teselada característica del micobionte en simbiosis.

pudieron ser separados parcialmente, aprovechando su diferente solubilidad en agua caliente, solubilizándose un polisacárido compuesto principalmente por β (1 \rightarrow 6)-glucosa de un material insoluble rico en β (1 \rightarrow 3)-glucosa.

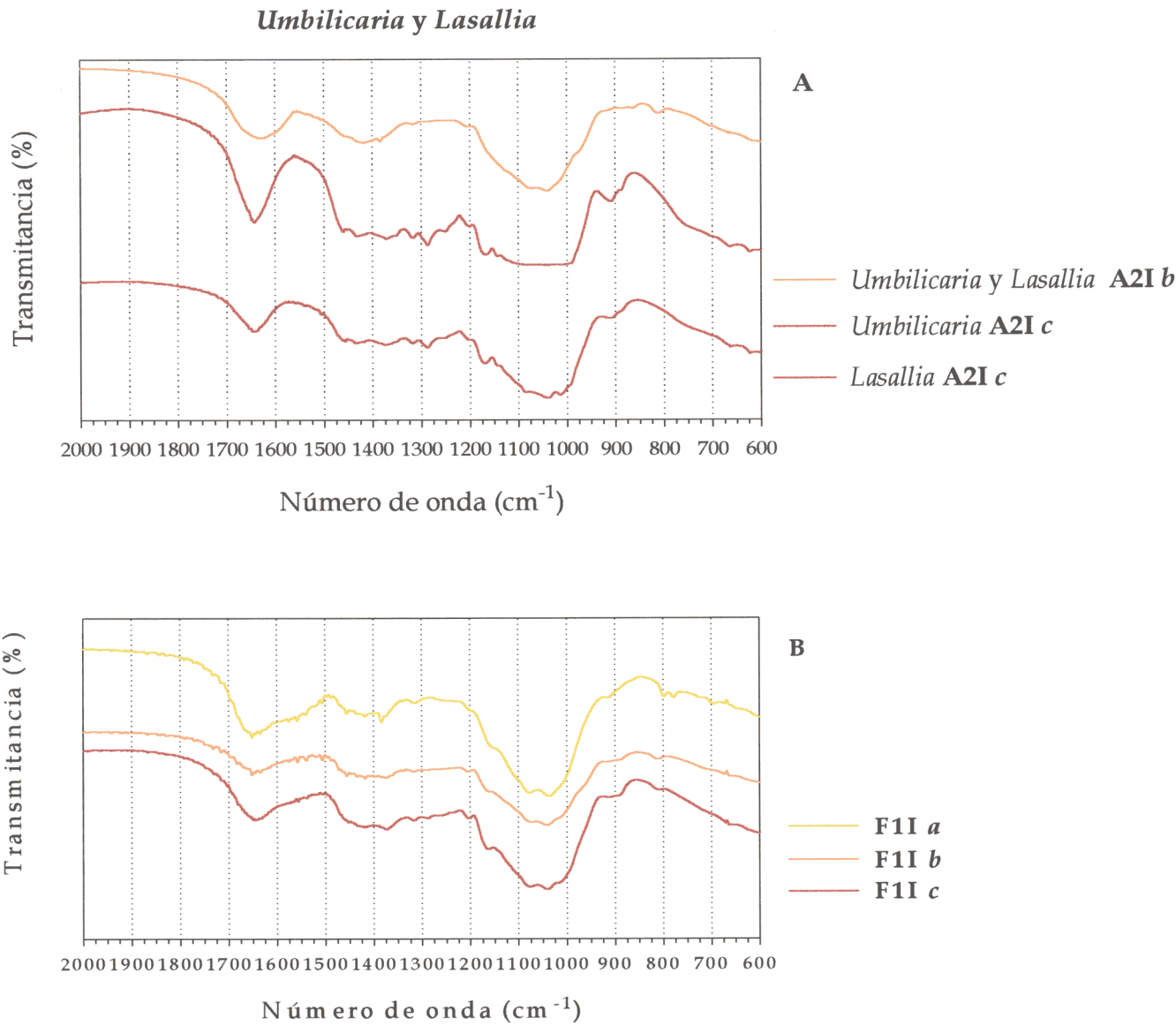


Figura 29. Espectros de infrarrojos de las fracciones insolubles en agua fría. A: Fracción extraída con agua caliente. B: Fracción extraída con álcali.

1. FAMILIA CLADONIACEAE

3.1. Resultados de la fraccionación

El talo de las especies *C. rangiformis*, *C. foliacea* y *C. iberica* fue sometido al protocolo de extracción descrito en el apartado 2 de Material y Métodos.

Las fracciones mayoritarias en las tres especies fueron las extraídas con álcali en autoclave y el residuo de las extracciones, F1 1S y F2 respectivamente (Figura 30).

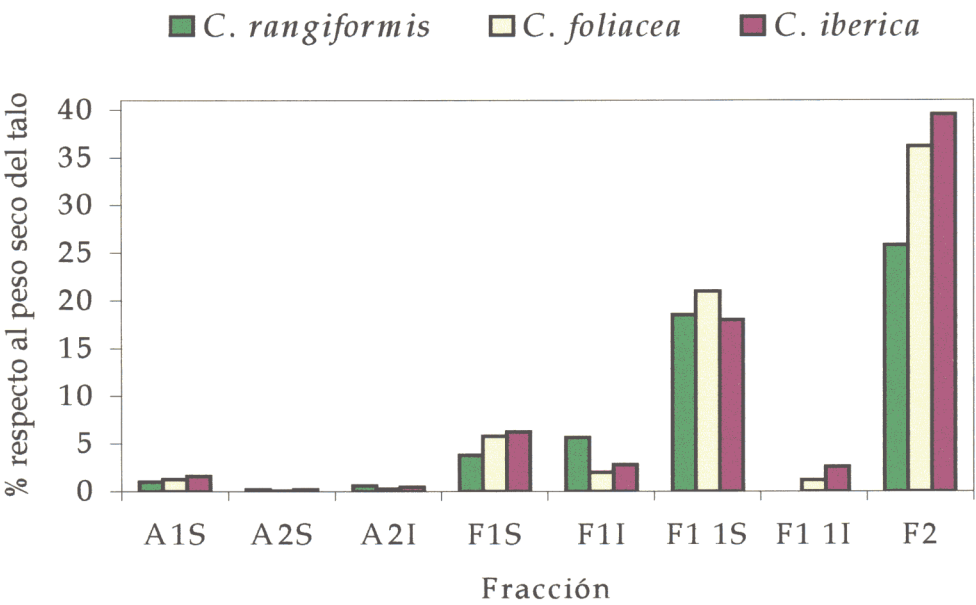


Figura 30. Porcentajes de las fracciones de tres especies de *Cladonia* extraídas de talo seco.

3.2. Análisis preliminar de las fracciones extraídas con agua (A2 y A1)

La extracción con agua caliente no rindió cantidad apreciable de material. Pese a este escaso rendimiento se realizaron espectros de infrarrojos y determinación de azúcares neutros.

El espectro de la fracción A1S mostró bandas intensas a 1650 y 1560 cm⁻¹ características del grupo -CO-NH- de las proteínas y por ello únicamente se hidrolizó para determinar su composición en monosacáridos y no se analizó en experimentos posteriores. El rendimiento en monosacáridos neutros de esta

fracción A1S en las tres especies (Tabla 19), fue bastante bajo. En la valoración de proteínas de estas fracciones se obtuvieron valores del 5 al 20%.

El espectro de A2S mostró bandas a 845 y 900 cm^{-1} confirmando la existencia de enlaces tipo α y β en la muestra. Aunque el monosacárido mayoritario fue glucosa, también se obtuvo manosa y galactosa (Tabla 18). Su bajo rendimiento fue probablemente debido a una mala hidrólisis. Mediante la determinación de los tipos de enlace por análisis de metilación, A2S resultó ser una mezcla de glucosa (1 \rightarrow 3) y manosa (1 \rightarrow 6). Debido a su pequeña proporción en el talo no se intentó una purificación posterior.

Respecto a las fracciones insolubles, por espectroscopía de infrarrojos se comprobó que A1I tenía principalmente composición lipídica y se hidrataba con gran rapidez, por tanto no se analizó su composición en azúcares ni se estimó su porcentaje. El espectro de la fracción A2I, aun no siendo muy característico de polisacárido, mostró bandas a 850 y 930 cm^{-1} propias de enlaces α . El monosacárido principal resultó ser glucosa.

3.3. Análisis preliminar de las fracciones extraídas con NaOH (F1)

El análisis de las fracciones solubles se centró en la fracción F1S, similar en composición y espectros a la F1 1S. Se probó una hidrólisis más fuerte con TFA 5M 5 horas a 100°C ya que los rendimientos con ácido sulfúrico fueron algo bajos, mejorando ligeramente los resultados. Los monosacáridos constituyentes fueron manosa el más abundante, seguido de galactosa y glucosa en orden decreciente de proporción. En el espectro de IR se detectaron bandas a 812, 900 y 1735 cm^{-1} .

Los resultados del ensayo colorimétrico para los ácidos urónicos dieron porcentajes de éstos diferentes para cada especie: 19% para *C. rangiformis*, 12% para *C. iberica* y 5% para *C. foliacea*.

La fracción F1I, constituida principalmente por glucosa, mostró un espectro de IR similar al de A2I y al de F1 1I.

Las fracciones de las tres especies objeto de estudio mostraron resultados similares.

3.4. Análisis de la fracción F2

Tanto los análisis químicos como los espectros de IR de la fracción F2 fueron muy similares para las tres especies de la familia así como en su comparación con los de la fracción F1 1S, por lo tanto se escogió la fracción F2 de *C. rangiformis* para su posterior análisis.

Se realizaron varios tipos de hidrólisis de la fracción F2 para deshacer el complejo glucano quitina y destruir el heteropolisacárido residual. Con HCl 1N 2 horas a 100° se logró el resultado esperado, recuperando un glucano y un residuo (3% del talo, formado por quitina y otros componentes) cuyo espectro se recoge en la Figura 31.

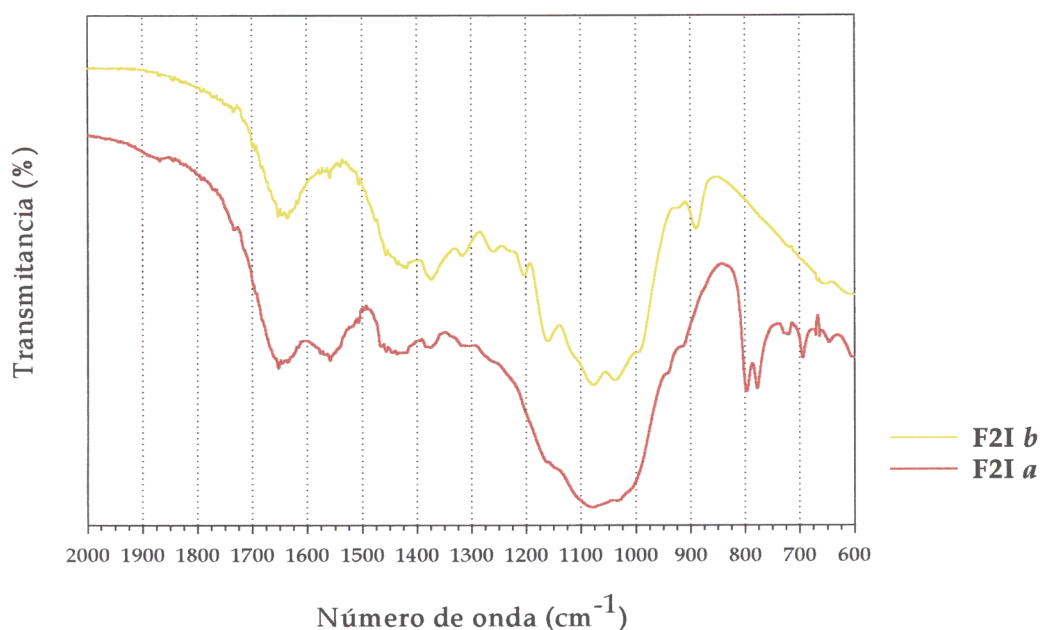


Figura 31. Espectros de infrarrojos de las fracciones finales de *C. rangiformis*. Glucano (F2I b) y el residuo final (F2I a).

Monosacárido	<i>C. rangiformis</i>			<i>C. foliacea</i>			<i>C. iberica</i>		
	A1S	A2S	A2I	A1S	A2S	A2I	A1S	A2S	A2I
ramnosa	-	-	-	7	7	-	-	-	-
arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	1
manosa	22	13	5	25	15	3	10	3	-
galactosa	19	9	2	22	10	2	6	2	-
glucosa	15	18	58	21	34	10	30	6	-
Total:	56	40	66	76	66	15	50	12	-

Monosacárido	<i>C. rangiformis</i>		<i>C. foliacea</i>		<i>C. iberica</i>	
	F1S	F1I	F1S	F1I	F1S	F1I
xilosa	1	-	2	-	4	-
ramnosa	-	-	1	-	3	-
arabinosa	1	1	1	1	2	-
manosa	18	4	25	4	27	9
galactosa	10	1	18	1	26	7
glucosa	9	9	9	9	11	16
Total:	39	15	57	15	72	32

Monosacárido	<i>C. rangiformis</i>		<i>C. foliacea</i>		<i>C. iberica</i>	
	F1 1S	F1 1I	F1 1S	F1 1I	F1 1S	F1 1I
ramnosa	-	-	-	-	-	3
arabinosa	-	-	1	-	-	-
manosa	45	-	23	10	48	29
galactosa	20	-	11	5	23	15
glucosa	29	-	13	15	24	17
Total:	95	-	48	30	94	64

Monosacárido	<i>C. rangiformis</i>	<i>C. foliacea</i>	<i>C. iberica</i>
	F2	F2	F2
arabinosa	-	-	1
manosa	51	33	38
galactosa	20	22	19
glucosa	28	27	28
Total:	99	81	87

Tabla 19. Porcentajes de los monosacáridos obtenidos tras hidrólisis de las distintas fracciones, determinados mediante cromatografía de gases como acetatos de alditol.

3.5. Purificación de la fracción soluble F1S

3.5.1. Cromatografía de exclusión molecular de la fracción soluble F1S

F1S (200 mg) se resuspendió en un pequeño volumen de agua (2 ml) y se centrifugó, reservando el sobrenadante. Al resuspender en agua se obtuvo un residuo insoluble (F1S I) no superior al 20%, cuyos componentes fueron manosa, galactosa y glucosa en las mismas proporciones que la fracción original F1S.

El material que permaneció soluble después de centrifugar se cargó en una columna con un gel de Sepharose CL 6B para su análisis mediante cromatografía de exclusión molecular.

Se recogieron fracciones de 4 ml y, en cada pico detectado mediante el método colorimétrico del fenol-sulfúrico, se hicieron lotes compuestos por el contenido de 5 tubos consecutivos, liofilizándolos. El contenido de cada uno de estos lotes se estudió por espectrometría de resonancia magnética nuclear de manera que se comprobó que el espectro era parecido a la fracción nativa pero con variaciones cuantitativas en diferentes lotes de un mismo pico cromatográfico. Esto significaba que había una mezcla de polisacáridos en estas fracciones que no se podía separar con el gel de Sepharose CL 6B.

3.5.2. Tratamiento con reactivo de Fehling.

Mediante el tratamiento con solución de Fehling de la fracción soluble en agua fría F1S, se separó un polisacárido que precipitó (en proporciones diferentes según la especie) pero el cobre interfería con el proceso de análisis posterior descartándose por ello este tratamiento. Como en los casos anteriores, y ya que se detectó la presencia de ácidos urónicos, se filtró la muestra en columna de intercambio iónico, obteniendo los resultados detallados en los apartados siguientes.

3.5.3. Cromatografía de intercambio iónico

En la Figura 32 se muestran los perfiles de elución de la cromatografía de intercambio iónico de la fracción F1S.

En las tres especies se obtuvo una fracción que no se retenía o fracción neutra denominada F1Sn. También un polisacárido quedó retenido en la columna y eluyó al aplicar el gradiente (F1Sg). En todos los casos se eluyeron dos picos, uno neutro y otro del gradiente, aunque esta última mostró un perfil más disperso, el análisis se centró en el pico principal.

3.5.4. Precipitación con 2-isopropanol

Aunque la fracción neutra eluyó en un solo pico, mediante análisis de ¹H-RMN comprobamos que se trataba de una mezcla. Al aplicar el gradiente, también se obtuvo una mezcla de polisacárido.

Por tanto fue necesario realizar un nuevo paso de purificación, precipitando estas fracciones adicionando propanol (apartado 2.4.2. de Material y Métodos). Se obtuvieron los siguientes porcentajes:

F1S <i>C. rangiformis</i>		
	F1S <i>n</i>	F1S <i>g</i>
Sobrenadante	11	8
Precipitado	30	32

F1S <i>C. foliacea</i>		
	F1S <i>n</i>	F1S <i>g</i>
Sobrenadante	17	14
Precipitado	27	34

F1S <i>C. iberica</i>		
	F1S <i>n</i>	F1S <i>g</i>
Sobrenadante	6	10
Precipitado	13	57

Tabla 20. Porcentajes de las fracciones, después de filtrar por columna y precipitar con propanol respecto a la fracción inicial F1S. El % restante hasta llegar a 100 corresponde al residuo.

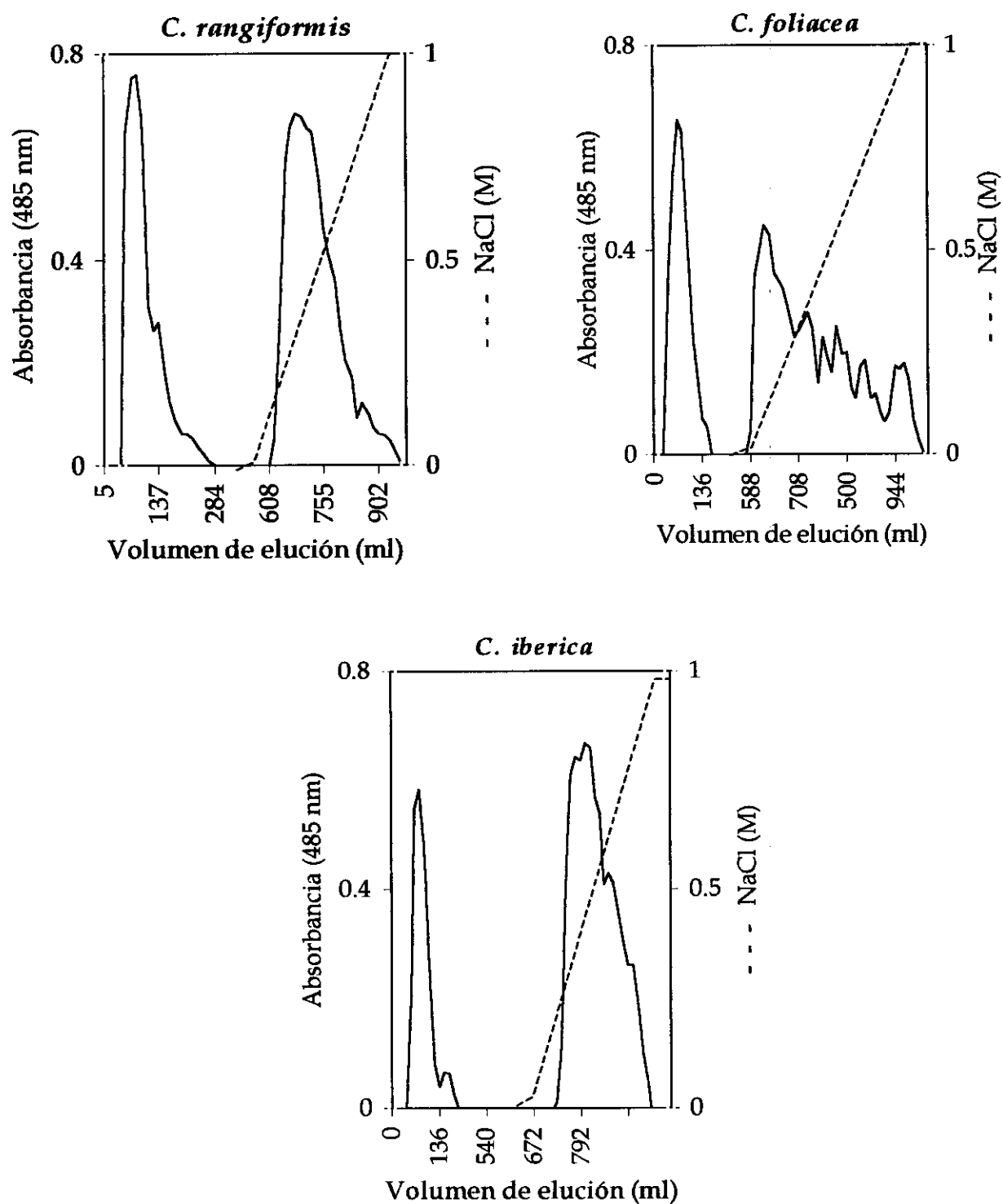


Figura 32. Filtración en gel DEAE Sepharose CL 6B de la fracción F1S de *C. rangiformis*, *C. foliacea* y *C. iberica*.

3.6. Metilación y análisis de las fracciones purificadas mediante tratamiento con isopropanol

En las siguientes tablas (21 y 22) se recogen los porcentajes de los tipos de enlace deducidos los análisis de metilación. Las fracciones sobrenadante, *F1Sn* SP de *C. iberica* y *F1Sn* SP y *F1Sg* SP de *C. foliacea*, no parecen contener carbohidratos y por tanto no han sido analizadas.

En líneas generales, los polisacáridos que precipitaban al adicionar propanol se enriquecían en enlaces de manosa (1→6) y galactopiranos terminal. En el sobrenadante (*F1Sn* SP ó *F1Sg* SP) aumentaban la galactofuranosa (terminal y con varios tipos de enlaces) y la manosa (1→2).

Tipo de enlace	<i>Cladonia rangiformis</i>			
	<i>F1Sn</i> SP	<i>F1Sn</i> PP	<i>F1Sg</i> SP	<i>F1Sg</i> PP
Galf-(1→	16	9	16	1
Galp-(1→	9	10	11	17
→3)-Galf-(1→	11	-	16	-
→5)-Galf-(1→	20	-	8	5
→6)-Galf-(1→	1	-	2	-
→3,6)-Galf-(1→	1	-	2	-
Glc p-(1→	9	17	5	16
→3)-Glc p-(1→	-	-	-	3
→2)-Glc p-(1→	-	4	-	-
→4)-Glc p-(1→	3	-	-	-
→2,4)-Glc p-(1→	5	13	3	8
→2,4,6)-Hex p-(1→	13	20	7	22
Manp-(1→	-	4	-	4
→2)-Manp-(1→	8	1	12	2
→6)-Manp-(1→	6	22	6	11
→2,3)-Manp-(1→	2	-	2	-
→2,6)-Manp-(1→	3	-	3	-
→4,6)-Manp-(1→	-	trazas	-	2
→2,3)-Ramnp-(1→	-	-	9	-
→3)-Ramnp-(1→	-	-	5	-
Xilp-(1→	-	-	13	-

Tabla 21. Tipos de enlaces de la fracción *F1S*. En el caso de la fracción gradiente, el polisacárido se redujo antes de la metilación aunque no se detectaron los grupos ácidos.

Tipo de enlace	<i>Cladonia foliacea</i>	
	F1Sn PP	F1Sg PP
Galf-(1→	-	-
Galp-(1→	42	39
→5)-Galf-(1→	-	2
→5,6)-Galf-(1→	2	-
Glcp-(1→	17	15
→2)-Glcp-(1→	-	2
→2,4,6)-Hexp-(1→	6	5
Manp-(1→	5	7
→2)-Manp-(1→	8	8
→6)-Manp-(1→	17	17
→2,6)-Manp-(1→	-	1
→4,6)-Manp-(1→	3	3

Tipo de enlace	<i>Cladonia iberica</i>		
	F1Sn PP	F1Sg SP	F1Sg PP
Galf-(1→	1	31	-
Galp-(1→	20	8	35
→3)-Galf-(1→	-	4	-
→6)-Galf-(1→	-	2	-
Glcp-(1→	5	13	15
→2)-Glcp-(1→	-	3	4
→2,4)-Glcp-(1→	17	3	8
→2,4,6)-Hexp-(1→	31	5	9
Manp-(1→	-	-	4
→2)-Manp-(1→	2	22	4
→6)-Manp-(1→	18	-	16
→3)-Manp-(1→	-	-	-
→2,3)-Manp-(1→	-	3	-
→2,6)-Manp-(1→	-	3	2
→4,6)-Manp-(1→	12	-	4

Tabla 22. Tipos de enlaces de la fracción F1S. En el caso de la fracción gradiente, el polisacárido se redujo antes de la metilación.

3.7. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

En la Figura 33 se representa el espectro de las fracciones F1Sn PP de las tres especies aquí estudiadas. Las similitudes entre ellos son numerosas, así como sus diferencias con los de otros géneros de otras familias.

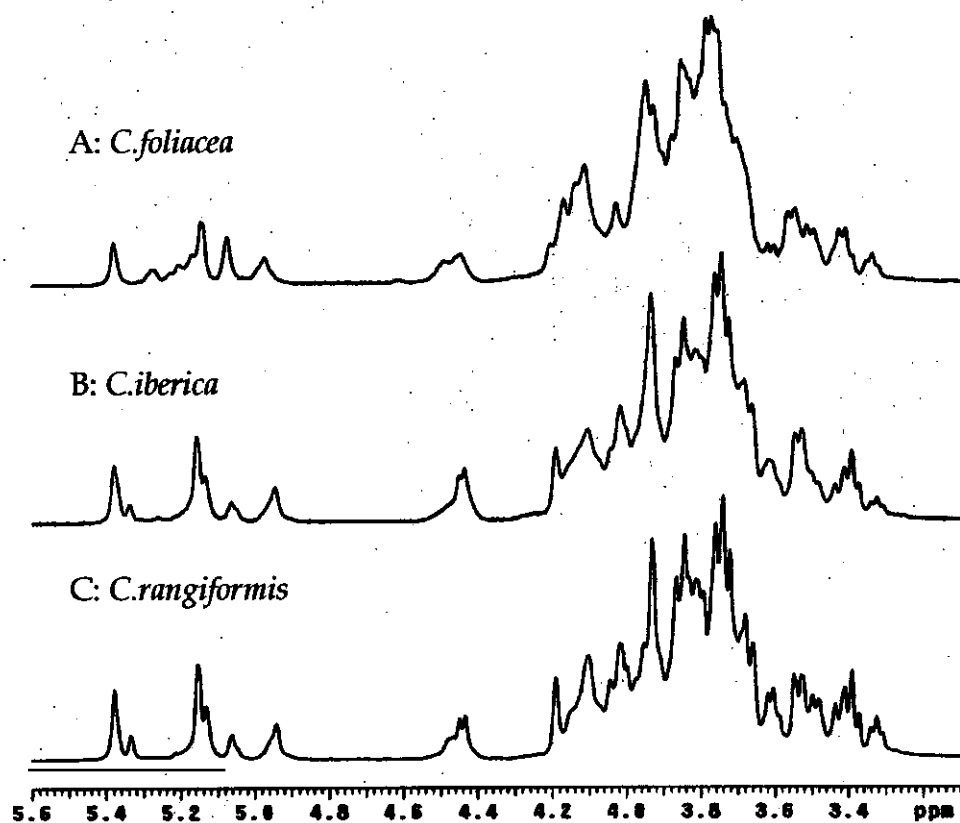


Figura 33. Espectros de ¹H-RMN de las fracciones F1Sn PP de las tres *Cladonias*

Se pueden apreciar que el espectro de *C. iberica* es más parecido al de *C. rangiformis* que el de *C. foliacea*.

El desplazamiento químico de la señal de manosa trisustituida, como en el caso de la familia Parmeliaceae también está presente.

La interpretación de éstos es compleja ya que presentan algunas señales minoritarias que parecen provenir de otro polisacárido que coprecipita.

3.8. Purificación y análisis de las fracciones insolubles en agua (A2I y F1I)

La hidrólisis de las fracciones insolubles rindió en general porcentajes muy bajos de monosacáridos, por lo que se planteó una purificación de la muestra como se explicó en el apartado 2.6. de Material y Métodos. Los porcentajes de las fracciones obtenidas respecto al total de la fracción se detallan en la siguiente tabla:

Especie	A2I <i>a</i>	A2I <i>b</i>	A2I <i>c</i>	F1I <i>a</i>	F1I <i>b</i>	F1I <i>c</i>
<i>C. rangiformis</i>	32	9	46	68	6	15
<i>C. foliacea</i>	60	11	13	54	13	26
<i>C. iberica</i>	66	10	12	78	4	11

Tabla 23. % de fracciones respecto a las iniciales A2I y F1I.

En la Figura 34 se representan los espectros de infrarrojos de las fracciones mencionadas, que fueron iguales en las tres especies. La fracción residuo, A2I *a* y F1I *a* resultó la más abundante pero no se detectaron monosacáridos neutros. La fracción A2I *b* y F1I *b* fue la más escasa y estaba constituida por glucosa, galactosa y manosa. A2I *c* y F1I *c* estaba constituida en los dos casos por glucosa y su espectro era semejante al descrito para el nigerano. Mediante metilación se determinaron los tipos de enlace y en ambos casos se detectó (1→3), (1→4), (1→3,4) y (1→2,3) glucosa. En el caso de *C. rangiformis*, se detectó además una pequeña cantidad de glucosa unida por enlaces (1→6).

Como se observa, sólo en estos casos el espectro de IR resultó típico de un polisacárido.

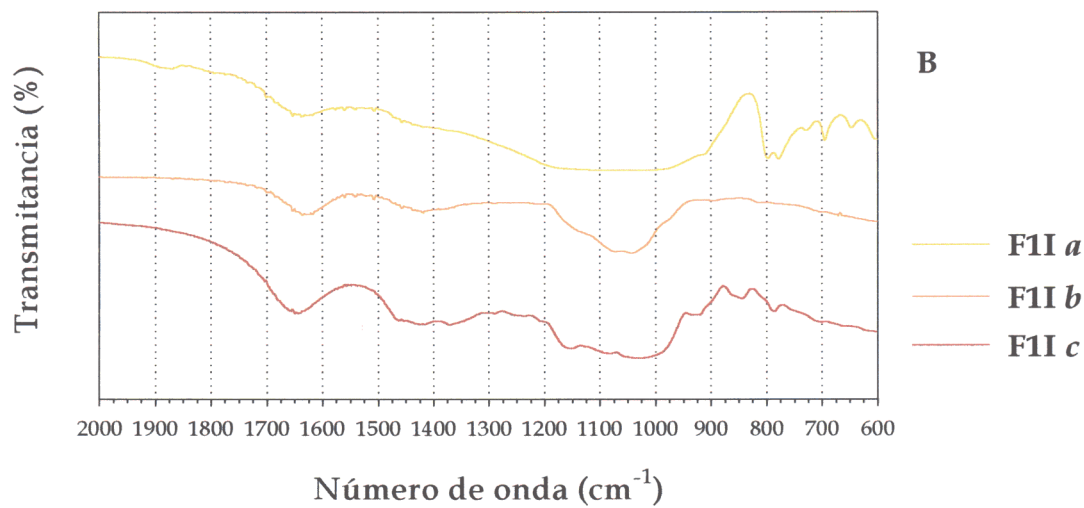
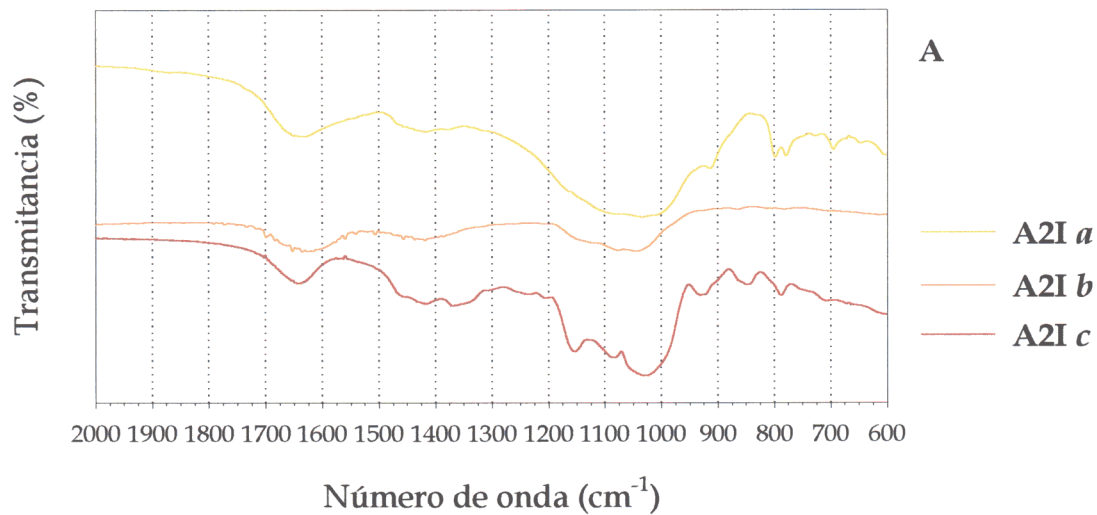
C. rangiformis, *C. foliacea* y *C. iberica*

Figura 34. Espectros de infrarrojos de las fracciones insolubles en agua fría. A: Fracción extraída con agua caliente. B: Fracción extraída con álcali.

4. VARIACIONES ESTACIONALES DE LAS FRACCIONES POLISACARÍDICAS

4.1.Análisis estacional de los pesos de los polisacáridos de *Pseudevernia furfuracea*.

4.1.1. Datos climáticos de las poblaciones estudiadas

De los datos ambientales que se emplean en los análisis posteriores (temperatura, precipitación y días de niebla recopilados en el apartado 4.4) se desprende que la población de Valsaín-Navacerrada se encuentra en una zona más fría que la de Presa del Pradillo-Rascafría (ver Figura 35). En ambos casos, la temperatura media trimestral del primer año (Verano 1997-Primavera 1998) estuvo altamente correlacionada con la del segundo (Verano 1998-Primavera 1999; N=8, $p<<0,001$). La precipitación, sin embargo, no se correlacionó entre los dos años (N=8, $p=0,60$). La precipitación total en el primer año fue mayor que en el segundo (Figura 35). Además, en el primer año la lluvia fue más abundante en Navacerrada-Valsaín que en Presa del Pradillo-Rascafría; en el segundo, las precipitaciones fueron más similares entre las dos localidades (Figura 35).

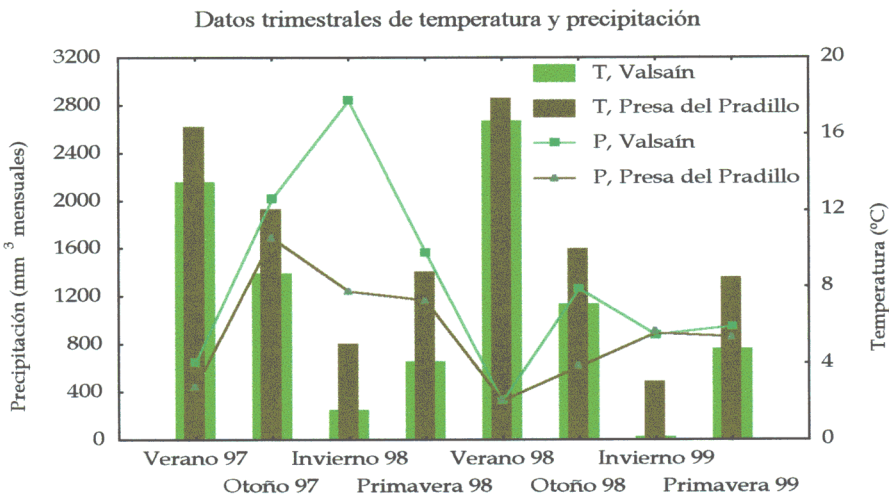


Figura 35. Climodiagrama de las dos localidades estudiadas durante los dos años en los que se llevó a cabo la toma de muestras (1997-1999).

4.1.2. Correlaciones simples entre fracciones y variables ambientales

Los porcentajes de las fracciones y los componentes mayoritarios de cada fracción se han descrito en el apartado 1. Los análisis químicos mostraron que cada fracción tenía más abundancia de un tipo de polisacárido, excepto A1, F0 y F2. Las fracciones se determinaron como sigue.

A2S: α glucano.

F1S: galactomanano.

A2I: β glucano.

F1I: glucano.

A1: glicoproteínas y lípidos.

F0: lípidos, pigmentos y fracción

F2: glucano-quitina y pigmentos

proteica desnaturalizada.

tipo esporopolenina.

Los resultados de los pesos extraídos y parcialmente purificados de las recolecciones estacionales se han recopilado en el apartado 4.4.

Los resultados de las correlaciones simples de los pesos de las distintas fracciones se resumen en la Tabla 24. Dichos resultados muestran que el peso de la fracción sobrenadante, A1 está relacionado negativamente (i.e. inversamente) con el peso de sus precipitados A2S ($p < 0,002$, $N=48$) y A2I ($p < 0,001$, $N=48$). Las fracciones A2S y A2I, por su parte, mostraron una relación directa entre sí ($p < 0,001$, $N=48$).

La correlación entre las fracciones F1S y F1I fue significativa e inversa, es decir al aumentar la cantidad de una la otra disminuye ($p < 0,001$, $N=48$). No se correlacionó su peso con el de su sobrenadante, F0.

El caso de la correlación F0 y A2I fue particular. Aunque su coeficiente de correlación fue elevado, tras la corrección de Bonferroni no puede ser considerado estadísticamente significativo (Tabla 24). Atendiendo a sus composiciones (β glucanos *vs.* lípidos y pigmentos), estas fracciones no parecen estar relacionadas, y por ello, la relación observada podría ser casual, consecuencia de la realización de múltiples estimas de probabilidad.

Pares de fracciones	r_s	p
A1 Y A2S	-0,43	0,002*
A1 Y A2I	-0,48	<0,001*
A1 Y F1S	0,05	0,717
A1 Y F1I	-0,33	0,023
A1 Y F2	-0,13	0,372
A2S Y A2I	0,69	<0,001*
A2S Y F1S	0,1	0,49
A2S Y F1I	0,19	0,222
A2S Y F2	-0,25	0,083
A2I Y F1S	0,23	0,11
A2I Y F1I	0,15	0,313
A2I Y F2	-0,09	0,555
F0 Y A1	0,26	0,07
F0 Y A2S	-0,16	0,261
F0 Y A2I	-0,4	0,004
F0 Y F1S	-0,15	0,306
F0 Y F1I	-0,11	0,448
F0 Y F2	-0,06	0,665
F1S Y F1I	-0,47	<0,001*
F1S Y F2	0,04	0,777
F1I Y F2	0,26	0,072

Tabla 24. Correlación entre los pesos de las fracciones (N=48 en todos los casos). Se muestran los coeficientes de correlación de Spearman (r_s) y la probabilidad (p). Con * y negrita se indican los resultados significativos tras la aplicación de la corrección de Bonferroni (el nuevo valor crítico tras esta corrección fue $p<0.002$)

Las correlaciones simples entre los pesos de cada fracción y los valores de las tres variables ambientales (precipitación, temperatura y días de niebla en ambas localidades combinadas) se muestran en la Tabla 25.

	Fracción	r_s	P
Temperatura	A1	0,37	0,009
	F0	0,08	0,606
	A2S	-0,13	0,386
	A2I	-0,14	0,343
	F1S	0,56	<0,001*
	F1I	-0,64	<0,001*
	F2	-0,08	0,597
Precipitación	A1	-0,09	0,547
	F0	0,27	0,061
	A2S	-0,38	<0,001*
	A2I	-0,32	0,027
	F1S	-0,40	<0,001*
	F1I	0,31	0,032
	F2	0,31	0,031
Días de niebla	A1	-0,19	0,189
	F0	0,25	0,085
	A2S	-0,03	0,830
	A2I	-0,12	0,429
	F1S	-0,45	<0,001*
	F1I	0,26	0,075
	F2	-0,39	0,005

Tabla 25. Correlaciones entre los pesos de las fracciones y las variables ambientales obtenidas en dos estaciones meteorológicas cercanas (N=48 en todos los casos). Con * y en negrita se indican los resultados significativos tras la aplicación de la corrección de Bonferroni (el nuevo valor crítico tras esta corrección fue $p<0,002$).

La precipitación se correlacionó inversamente con A2S ($p < 0,001$, $N=48$) y F1S ($p < 0,001$, $N=48$), fracciones con similares proporciones de materia respecto al talo seco, aunque cada una con un polisacárido mayoritario. Las fracciones A2I, F1I y F2 mostraron tendencias, no estadísticamente significativas, a correlacionarse, de modo negativo la primera y positivo las dos últimas, con la precipitación.

La fracción A1, rica en glicoproteínas y lípidos mostró, como en el caso de las fracciones A2I y F1I, una tendencia a relacionarse con la temperatura.

La temperatura también se correlacionó con las fracciones de polisacárido más internas y de extracción con álcali: F1S ($p < 0,001$, $N=48$) y F1I ($p < 0,001$, $N=48$). Al aumentar la temperatura en las distintas estaciones del año, aumentó la cantidad relativa de F1S de modo proporcional. Como esta fracción estaba correlacionada inversamente con F1I, es lógico que la correlación de F1I con esta variable ambiental también fuera negativa. Es decir, cuanto mayor fue la temperatura, menor la cantidad de F1I.

Los días de niebla se correlacionaron con la fracción F1S ($p < 0,001$, $N=48$) de la misma forma con que lo hacía con la precipitación.

Las correlaciones fracciones-variables ambientales para cada población por separado mostraron escasas diferencias con el patrón observado. En general, las correlaciones descritas se mantuvieron, aunque algunas dejaron de ser estadísticamente significativas. Ello podría deberse a la variación de la temperatura, la precipitación y, sobre todo, los días de niebla existente entre las dos localidades. Este puede ser el caso de la correlación entre la fracción F1S y los días de niebla en Pradillo-Rascafría, ya que en esta zona apenas tuvo lugar este fenómeno. Quizá sea un factor ambiental poco representativo, ya que su fluctuación es semejante a la de la precipitación no aportando otro tipo de información. En la presa del Pradillo-Rascafría la correlación A2S-precipitación tampoco fue significativa ($N=24$, $p=0,114$).

4.1.3. Análisis de las Componentes Principales

En la Tabla 26 se muestran los resultados del PCA realizado con el conjunto de las variables normalizadas (A1, A2S, A2I, F0, F1S, F1I y F2).

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
F1S	0,197	-0,902	-0,044
F1I	0,355	0,819	-0,086
A2S	0,606	0,098	0,644
A2I	0,791	-0,087	0,449
F2	0,092	0,055	-0,922
A1	-0,748	-0,289	0,024
F0	-0,756	0,073	0,098
% varianza	22,98	15,94	14,86
Autovalor	2,61	1,62	1,15

Tabla 26. Componentes principales obtenidas a partir del conjunto de fracciones. En negrita se destaca los coeficientes de correlación significativos para N=48; ($r > 0,37$; $p < 0,05$).

El PCA agrupó todas las variables incluidas en tres factores independientes que explicaban aproximadamente un 54% de la varianza total, definiendo un patrón de relaciones entre las variables bastante coherente con los análisis anteriores.

El primer factor, que explicó casi un 23% de la varianza total, agrupó los sobrenadantes A1 y F0 con signo negativo, por una parte, y por otra, las fracciones A2S y A2I, definiendo un gradiente de variación entre menor cantidad de sobrenadantes y mayor cantidad de precipitado A2S y A2I. El segundo factor, que explicó casi un 16% de la varianza, agrupó las variaciones de la fracción polisacáridica extraída con álcali, mostrando un eje de variación en el que F1S disminuye aumentando F1I. No existió relación entre estos precipitados y su sobrenadante F0. El tercer factor (casi 15% de la varianza) muestra un gradiente entre F2 (negativo) y A2S/A2I (positivos). Este factor se puede interpretar como la variación de la producción de glucanos

fundamentalmente fúngicos y el residuo principalmente compuesto por el “esqueleto” del micobionte y fotobionte, considerando que ni A2S ni A2I están correlacionados individualmente con F2 (Tabla 24).

Las correlaciones entre los valores de los tres factores o componentes principales obtenidos en el PCA con las variables temperatura y precipitación se muestran en la Tabla 27. Los días de niebla no se consideran en este caso debido a que no aportan información relevante.

Par de variables		r_s	r^2	p
Temperatura	Factor 1	-0,15	0,02	0,319
	Factor 2	-0,69	0,48	<<0,001*
	Factor 3	0,02	0,00	0,905
Precipitación	Factor 1	-0,29	0,08	0,046*
	Factor 2	0,47	0,22	<0,001*
	Factor 3	-0,36	0,13	0,012*

Tabla 27. Correlación de Spearman entre los componentes principales y la temperatura y precipitación. Dicho coeficiente al cuadrado representa la varianza explicada. Con asterisco y en negrita se resaltan los resultados significativos.

El Factor 1, que agrupaba las fracciones A1 y F0, se correlacionó negativamente con la precipitación. No obstante, sólo un 8% de la varianza es explicada en esta débil correlación. El Factor 2, que agrupaba a las fracciones F1S y F1I, se relacionó de modo significativo negativamente con la temperatura y positivamente con la precipitación. El Factor 3 que agrupaba las fracciones A2S, A2I y F2, por su parte, se correlacionó del mismo modo que el Factor 1 con la precipitación, pero explicando un porcentaje de varianza algo mayor (13%). Ello probablemente pueda ser debido a que las variables comunes, A2S y A2I, a su vez, se correlacionan independientemente con la precipitación (Tabla 25).

4.1.4. Variación estacional y poblacional mediante análisis múltiple de la varianza (MANOVA)

La variación estacional, anual y poblacional de los pesos logaritmizados de las fracciones A2S, A2I, F1S, F1I y F2 consideradas en conjunto (véase realización del MANOVA en Material y Métodos), mostraron la existencia de diferencias significativas entre todos estos factores (Tabla 28). En este análisis no se emplearon la temperatura ni la precipitación como factores o covariantes, ya que su variación y significado ambiental puede explicarse a través de una única variable, la estación del año. Por tanto, la inclusión de estas variables sólo aportaría redundancia a este análisis.

Fracciones A2S, A2I, F1S, F1I y F2				
Factor	λ de Wilks	g.l	F	p
Estación	0,071	15,97	10,354	<0,000*
Población	0,546	5,35	5,820	<0,000*
Año	0,227	5,35	23,791	<0,000*
Interacción	0,487	15,97	1,929	<0,03*

Tabla 28. Resultados del MANOVA empleando las fracciones A2S, A2I, F1S, F1I y F2. Con asterisco y en negrita se resaltan los resultados estadísticamente significativos.

El análisis resultó significativo para todos sus factores. Cuando un factor tiene dos niveles (como es el caso de la población y el año) entonces $(1-\lambda)$ equivale al porcentaje de la varianza explicado. De este modo, el factor población llegó a explicar el 45% de la varianza encontrada y el factor año hasta un 77%. El término interacción es significativo, lo que indica que los diversos efectos no pueden interpretarse por separado. Los resultados de este MANOVA muestran la existencia de diferencias estacionales, anuales y poblacionales para el conjunto de fracciones analizado. Por ello, se hace necesario determinar las variaciones de las fracciones por separado, lo que se aborda a continuación.

4.1.5. Análisis de la varianza (ANOVA/ANCOVA) parciales

4.1.5.1 Fracciones extraídas con agua (A1, A2S y A2I)

El modelo empleado incluyó, en ambos casos, la fracción A1 como covariante, dado que está correlacionada inversamente con ellas (Tabla 29). De este modo se anula su posible influencia en las variaciones. También se empleó como covariante la fracción F2 (correlacionada con A2S y A2I, véase Tabla 27) pero los resultados no variaron, por lo que no se muestran. Los resultados de las ANCOVAs para estas dos fracciones por separado se muestran en las Tablas 29 y 30.

Fracción A2S			
Factor	g.l.	F	p
Estación	3,31	9,889	<<0,001*
Población	1,31	0,039	0,845
Año	1,31	31,723	<<0,001*
Interacción	3,31	2,380	0,089

Tabla 29. Resumen de los resultados del ANCOVA realizado con los pesos de la fracción A2S empleando como covariante la fracción A1.

Fracción A2I			
Factor	g.l.	F	p
Estación	3,31	18,483	<<0,001*
Población	1,31	13,959	<0,001*
Año	1,31	57,386	<<0,001*
Interacción	3,31	13,973	<<0,001*

Tabla 30. Resumen de los resultados del ANCOVA realizado con los pesos de la fracción A2I empleando como covariante la fracción A1.

En ambos casos, las variaciones estacionales (i.e., diferencias entre estaciones) fueron significativas y se repitieron durante los dos años de muestreo, aunque ligeramente atenuadas en el 2º año. Este resultado puede ser esperado considerando que A2S y A2I están correlacionadas positivamente

(Tabla 24). En general, el patrón de variación estacional que se observa en estas dos fracciones, muestra mayor producción de polisacáridos en Primavera. En Verano y Otoño, dicha producción disminuye, alcanzando su mínimo en esta última estación. En Invierno, la producción vuelve a incrementarse, alcanzando valores ligeramente inferiores a los de Primavera (Figura 36).

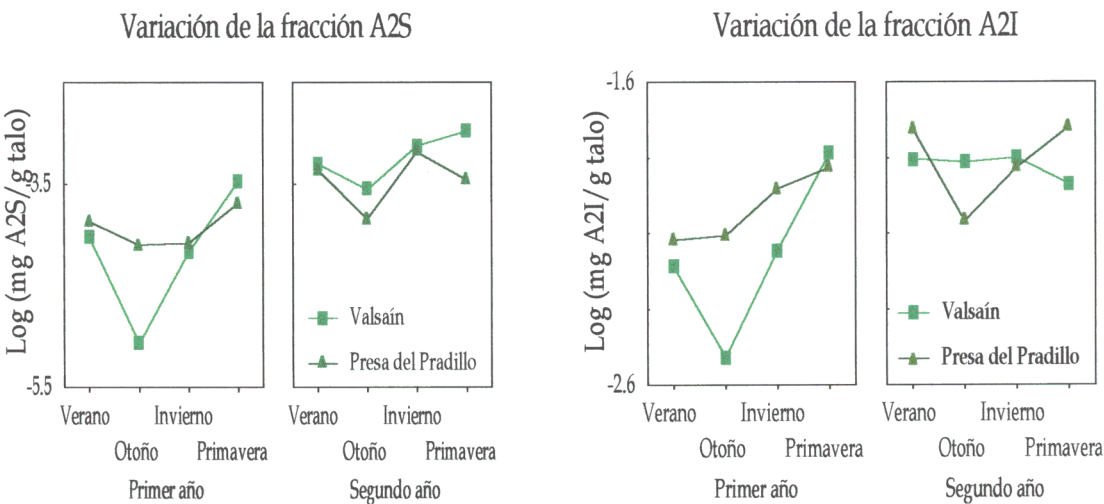


Figura 36. Variaciones en los pesos de las fracciones A2S (pareja de gráficos de la izquierda) y A2I (pareja de gráficos de la derecha) durante los dos años de muestreo (Verano 1997-Primavera 1999). En todos los casos, se muestran los valores medios.

Las variaciones anuales de las fracciones A2I y A2S por separado, considerando las dos localidades en conjunto, mostraron en todos los casos diferencias estadísticamente significativas (Tablas 29 y 30). La producción de polisacáridos fue inferior durante el primer año en estas fracciones.

Las variaciones interpoblacionales en las fracciones por separado mostraron la existencia de diferencias significativas para la fracción A2I, pero no para la fracción A2S. En general, el rendimiento de A2I fue mayor en la localidad presa del Pradillo que en la localidad Valsaín.

El efecto interacción triple (estación, año y población) fue significativo para A2I pero no para A2S (Tablas 29 y 30). Es decir, el efecto de los factores en la variación encontrada en A2I no fue aditivo y, por tanto, no se realizaron ANOVAs para esta fracción con cada uno de los factores citados.

Para el caso de la fracción A2S sí se llevaron a cabo ANOVAS parciales para verificar la existencia de variaciones estacionales en los dos años por separado. Los resultados indican la existencia de diferencias significativas para las variaciones estacionales en la localidad Valsaín solamente en el 1^{er} año (ANOVA: $F_{3,12}=18,67$; $p<0,005$).

El ANOVA realizado empleando la fracción A1 también mostró la existencia de diferencias estacionales (ANOVA: $F_{3,32}= 23,153$; $p<<0,001$). La variación en el peso de la fracción A1 es coherente en ambas localidades, mostrando un máximo en los meses de verano y una posterior disminución progresiva hasta la primavera, donde de nuevo comienza a incrementarse la concentración.

4.1.5.2 Fracciones extraídas con álcali (F1S y F1I)

Los ANCOVAs realizados con las fracciones F1S y F1I por separado empleando como covariante la fracción F0 se muestran en la Tabla 31. Como se mostró anteriormente, ambas fracciones no están correlacionadas, aunque teóricamente podría considerarse F0 como una causa de variación de F1S y F1I, al ser el sobrenadante de estas fracciones (Tabla 24).

Fracción F1S			
Factor	g.l.	F	P
Estación	3, 31	8,255	$<<0,001^*$
Población	1,31	5,483	0,026*
Año	1,31	3,259	0,081
Interacción	3,31	1,425	0,254

Fracción F1I			
Factor	g.l.	F	p
Estación	3, 31	97,324	$<<0,001^*$
Población	1,31	11,158	0,002*
Año	1,31	67,754	$<<0,001^*$
Interacción	3,31	4,836	0,007*

Tabla 31. Resultados de los dos ANCOVAs realizados para las fracciones F1S y F1I, en ambos casos empleando como covariante la fracción F0.

Los resultados muestran diferencias estacionales y poblacionales en las dos fracciones. En el caso de F1I, además, existen diferencias entre los dos años de muestreo, siendo el término interacción significativo (por tanto, no pueden interpretarse aisladamente los distintos efectos).

En la Figura 37 se muestran las variaciones estacionales observadas para las dos fracciones.

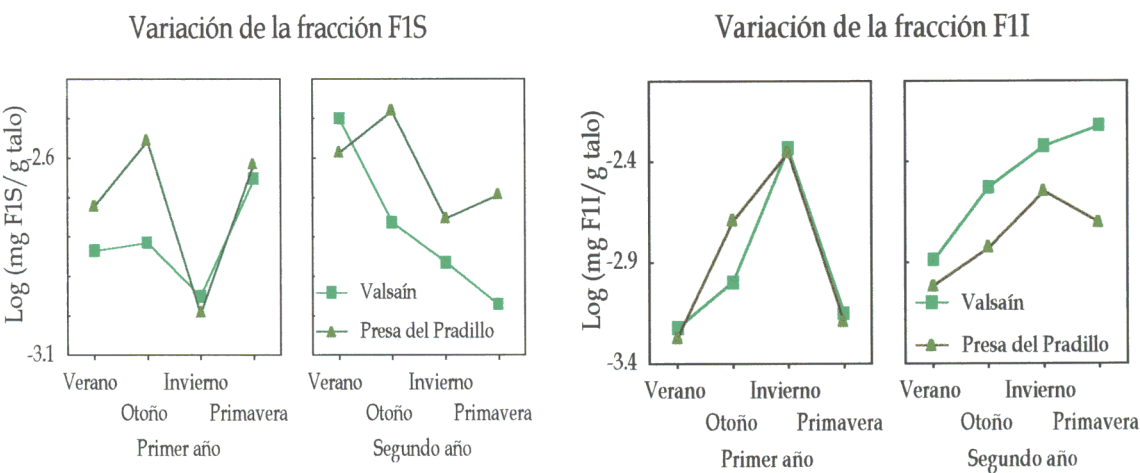


Figura 37. Variaciones de las fracciones F1S (pareja de gráficos de la izquierda) y F1I (pareja de gráficos de la derecha) en los dos años de muestreo. En todos los casos, se muestran los valores medios.

Como se indicó en la Tabla 24, que muestra correlaciones entre fracciones, F1S se relaciona inversamente con F1I. Para el caso de la fracción F1S, se observó menor producción en la recolección de Invierno que en el resto de las estaciones. Esto debe ser la causa de la existencia de diferencias significativas en la variación estacional (Figura 37).

En F1I la variación estacional fue más marcada. Analizando los dos años conjuntamente, durante el Verano la producción polisacáridica fue escasa, aumentando progresivamente en Otoño e Invierno, para volver a disminuir en primavera (Figura 37). Este patrón de variación estacional fue también observado en la fracción primigenia F1. En general, en el primer año se obtuvo más peso de esta fracción que en el segundo.

Existieron diferencias interpoblacionales cuantitativas estadísticamente significativas en las dos fracciones. Para el caso de F1S, la población de Valsaín fue “menos productiva” que la de la Presa del Pradillo. Respecto a F1I, las tendencias se invirtieron, obteniéndose mayor peso de polisacáridos en Valsaín.

El efecto de la interacción fue significativo para la fracción F1I, pero no para F1S. Los ANCOVAs parciales realizados con esta última fracción (covariante: F0) pusieron de manifiesto diferencias estacionales significativas entre las dos poblaciones, únicamente durante el primer año (ANCOVA: $F_{3,7}=12,455$; $p<0,003$).

4.1.5.3. Análisis del residuo F2

Los resultados obtenidos tras la realización de un ANOVA empleando la variable F2 y los tres factores se resume en la Tabla 32.

Fracción F2			
Factor	g. l.	F	p
Estación	3,32	13,366	<0,000*
Población	1,32	12,265	<0,001*
Año	1,32	0,698	0,409
Interacción	3,32	1,802	0,163

Tabla 32. Resultados del ANOVA para la fracción F2. Con asterisco y en negrita se resaltan los resultados significativos.

La variación del peso de la fracción F2 no fue estadísticamente diferente entre los dos años de muestreo, así como la interacción de los tres factores. Sin embargo, existieron diferencias estacionales y poblacionales en el peso de la muestra. En la Figura 38 se muestra las variaciones estacionales de este residuo.

El mayor peso relativo de esta fracción se observa en Otoño, de forma constante en las dos poblaciones y durante los dos años. Dicho peso disminuye progresivamente, hasta llegar a un mínimo en Verano. (Figura 38).

Las ANOVAs parciales realizadas con un único factor o variable independiente (factor estacional), mostraron diferencias significativos entre

estaciones en todos los años y poblaciones ($F_{3,8}=15,838$; $p<0,003$). La excepción fue el 2º año en la localidad Valsaín, en el que no se observaron diferencias estacionales ($F_{3,8}=0,643$; $p>0,606$). En todas las ocasiones, excepto en el Otoño del primer año, se obtuvo mayor cantidad de polisacáridos en la población de Presa del Pradillo que en la de Valsaín. Analizando los resultados de las dos poblaciones en conjunto, en el primer año se extrajo más cantidad de F1S que el segundo pero esta diferencia no fue significativa.

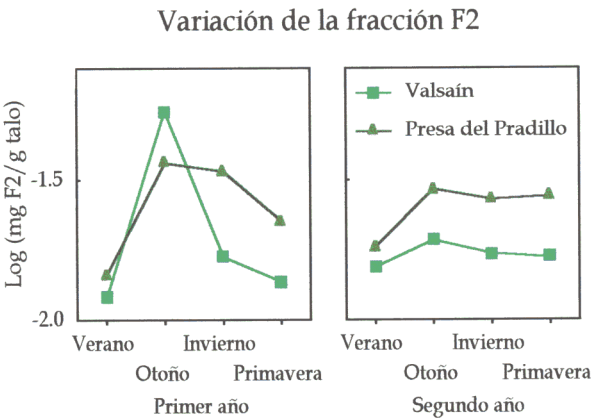


Figura 38. Variaciones de la fracción F2 en los meses de recogida de las muestras y respecto a las dos localidades. En todos los casos, se muestran los valores medios.

4.2.Análisis estacional de los polisacáridos de *Lasallia pustulata*

4.2.1. Datos climáticos de la población estudiada

En el robledal donde se recogieron las muestras de este liquen (localidad El Escorial), el factor ambiental de entre los aquí considerados que mayor variación estacional observó fue la temperatura. Varió 19°C entre el Invierno y el Verano y a modo de comparación, en la localidad de muestreo de *Pseudevernia furfuracea*, -Valsaín- sólo varió 11°C. Durante el primer año, las precipitaciones primaverales fueron marcadamente superiores a las del segundo año. En la Figura 39 se detallan la precipitación y temperaturas obtenidas de la estación meteorológica ‘Los Llanillos’, próxima a la localidad de muestreo El Escorial.

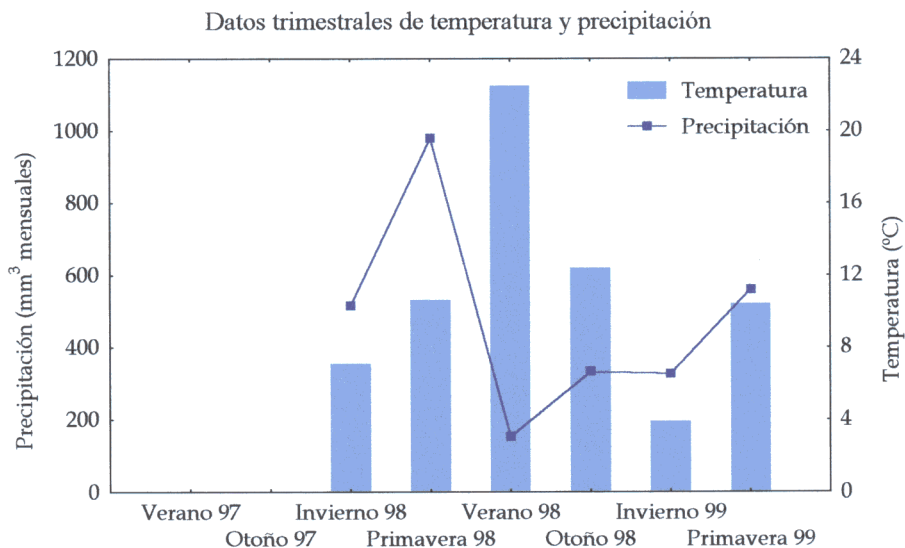


Figura 39. Climodiagrama de los meses en los que se llevó a cabo la toma de muestras (1998-1999).

4.2.2. Correlaciones simples entre fracciones y variables ambientales

Del mismo modo que en el apartado 4.1, cada fracción se determinó que estaba compuesta por un tipo de polisacárido mayoritario. A continuación se refieren las fracciones analizadas y sus componentes.

- A2:β-(1→6) glucano.

A1: glicoproteínas y lípidos.

F1I: β-(1→6) y β-(1→3) glucanos.
- F1S: galactomananos.

F2: pigmentos y glucano-quitina.

F0: pigmentos, lípidos y proteínas desnaturalizadas.

Las fracciones obtenidas A1, A2, F0, F1S, F1I y F2, cuyos pesos se recogen en el apartado 4.4, se correlacionaron entre sí como el caso anterior, siendo después relacionadas con las variables de temperatura y precipitación. No se incluyeron en dicho análisis las estaciones de Verano 97 y Otoño 97 ya que no dispusimos de datos meteorológicos de estas fechas. Los resultados obtenidos en las correlaciones entre los pesos de las fracciones se detallan en la Tabla 32.

Par de variables	r_s	p
A1 Y A2	-0,04	0,87
A1 Y F1S	0,17	0,497
A1 Y F1I	-0,35	0,149
A1 Y F2	-0,11	0,68
F0 Y A2	0,712	<0,001*
F0 Y A2	-0,18	0,470
F0 Y F1S	0,08	0,758
F0 Y F1I	-0,02	0,925
F0 Y F2	-0,28	0,261
A2 Y F1S	0,171	0,497
A2 Y F1I	-0,29	0,246
A2 Y F2	0,12	0,633
F1S Y F1I	-0,3	0,228
F1S Y F2	-0,77	<0,001*
F1I Y F2	0,19	0,436

Tabla 32. Correlación entre los pesos de las fracciones (N=18 en todos los casos). Se muestran los coeficientes de correlación de Spearman (r_s) y la probabilidad (p). Con * y negrita se indican los resultados significativos tras la aplicación de la corrección de Bonferroni (el nuevo valor crítico tras esta corrección fue $p<0,002$)

Existieron pocas correlaciones significativas entre los pesos de las fracciones de *Lasallia*. Por un lado, la fracción F1S se correlacionó negativamente con F2 ($p<0,001$; N=18) y por otro, los sobrenadantes (A1 y F0) obtenidos se correlacionaron entre sí de forma positiva ($p<0,001$; N=18), es decir, cuanto más peso hubo de uno también se encontró más del otro.

Los resultados de las correlaciones entre los pesos de las fracciones y cada una de las variables ambientales consideradas se muestran en la Tabla 33.

Fracción		r_s	p
Temperatura	A1	0,33	0,176
	F0	-0,12	0,638
	A2	0,71	<0,001*
	F1S	-0,13	0,608
	F1I	-0,67	0,002*
	F2	0,26	0,289
Precipitación	A1	-0,46	0,055
	F0	-0,59	<0,01
	A2	-0,12	0,619
	F1S	-0,00	0,98
	F1I	0,16	0,534
	F2	0,16	0,525

Tabla 33. Correlación entre los pesos de las fracciones (N=18 en todos los casos) y las variables ambientales. Se muestran los coeficientes de correlación de Spearman (r_s) y la probabilidad (p). Con * y negrita se indican los resultados significativos tras la aplicación de la corrección de Bonferroni (el nuevo valor crítico tras esta corrección fue $p<0,002$)

Tras la corrección de Bonferroni, únicamente dos correlaciones resultaron significativas estadísticamente. Éstas fueron la correlación entre la fracción A2 y la temperatura (relación positiva; $p<0,001$; N=18) y la correlación entre la fracción F1I y la temperatura (negativa; $p<0,002$; N=18).

4.2.3. Análisis de las Componentes Principales

Como en el caso de *Pseudevernia*, se realizó un Análisis de las Componentes Principales (PCA) para verificar las relaciones que se habían observado mediante las correlaciones simples. Este PCA, realizado con los pesos de las fracciones A2, F1S, F1I, F2, A1 y F0 arrojó tres factores (Tabla 34).

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
A2	0,203	-0,125	0,795*
F1S	-0,043	0,899*	0,015
F1I	0,118	-0,139	-0,830*
F2	0,127	-0,862*	-0,004
A1	-0,917*	0,103	0,046
F0	-0,912*	0,075	-0,125
% Var. expl	17,44	16,03	13,39
Autovalor	2.04	1.43	1.21

Tabla 34, Resultados del análisis de componentes principales realizado con las fracciones A2, F1S, F1I, F2, A1 y F0. Con asterisco y en negrita se destacan los coeficientes de correlación significativos (N=18, $r > 0,47$, $p < 0,05$).

El primer componente principal (Factor 1), explicó casi un 18% de la varianza total, y agrupó las fracciones sobrenadante A1 y F0, (al igual que ocurría en el caso de *Pseudevernia*) ambas con coeficiente negativo. No se encontró que otras fracciones precipitado estuvieran relacionadas en este Factor 1.

El Factor 2 (16% de la varianza) relacionó las fracciones F1S (positivamente) y F2 (negativamente). Muestra un gradiente de variación entre mayores valores de F1S y menores de F2.

El Factor 3 (13% de la varianza), agrupó dos fracciones de composición semejante: F1I (negativamente) y A2 (positivamente). Este factor se interpreta como un eje de variación entre elevados pesos de la fracción A2 y pequeños valores de la fracción F1I. Este tercer factor, del mismo modo que ocurría al Factor 3 en *Pseudevernia* (Tabla 26), puede ser interpretado como el gradiente de la producción de glucanos más externos fundamentalmente fúngicos (A2 positivo) y F1I, compuesto por polisacáridos más internos de pared del micobionte (negativo).

La correlación entre los tres componentes principales (Factores 1, 2 y 3) y las variables meteorológicas se muestra en la Tabla 35.

Par de variables		r_s	r^2	p
Temperatura	Factor 1	-0,16	0,26	0,526
	Factor 2	-0,21	0,44	0,403
	Factor 3	0,89	0,79	<0,000*
Precipitación	Factor 1	0,52	0,27	0,028*
	Factor 2	0,05	0,02	0,853
	Factor 3	-0,32	0,10	0,200

Tabla 35. Correlación de Spearman entre los tres factores obtenidos en el PCA y la temperatura y la precipitación. El coeficiente de correlación (r_s) elevado al cuadrado estima la varianza explicada. Con asterisco y letra negrita se resaltan los resultados significativos.

En este caso, el Factor 1, que agrupa a los sobrenadantes, se correlacionó positivamente con la precipitación. El Factor 2 no estuvo correlacionado con estas variables ambientales. El Factor 3, por su parte, se correlacionó positivamente con la temperatura.

4.2.4. Variación estacional mediante análisis múltiple de la varianza (MANOVA)

Los resultados del MANOVA realizado con las variables A2, F1S, F1I y F2 (con todas las estaciones de los dos años) se exponen en la Tabla 36.

Fracciones A2, F1S, F1I y F2				
Factor	λ de Wilks	g. l.	F	p
Estación	0,041	12,34	6.818	<<0,001*
Año	0,210	4,13	12.218	<<0,001*
Interacción	0,028	12,34	8.235	<<0,001*

Tabla 36. Resultados del MANOVA de las fracciones A2, F1S, F1I y F2. Con asterisco y en negrita se resaltan los resultados significativos.

Los resultados indican la existencia de diferencias estacionales y anuales para el conjunto de las fracciones. El término interacción también resultó significativo. Por ello, se llevaron a cabo análisis parciales (ANCOVAs 6 ANOVAs protegidos) con cada fracción.

4.2.5. Análisis de la varianza (ANOVA/ANCOVA) parciales

4.2.5.1. Análisis de la fracciones extraídas con agua (A1 y A2)

El ANCOVA realizado con los pesos de la fracción A2 se muestra en la Tabla 37. Se empleó en este caso como covariante la fracción A1; no obstante, la exclusión de esta covariante no altera los resultados.

Fracción A2			
Factor	F	g. l.	p
Estación	4,715	3,15	0,016*
Año	0,815	1,15	0,381
Interacción	8,586	3,15	<0,001*

Tabla 37. Resultados del ANCOVA realizado con la fracción A2. Covariante: fracción A1. Con asterisco y en negrita se resaltan los resultados significativos.

Las variaciones estacionales de los pesos de la fracción A2 (pustulano) difirieron significativamente. El efecto del año, por el contrario, no mostró diferencias. El término interacción fue significativo y, por tanto, el patrón de variación estacional hubo de ser estimado con los datos de los dos años conjuntamente (Figura 40). El patrón de variación estacional de esta fracción incluye menores pesos en Verano y en Invierno, así como mayores valores en Otoño y Primavera. (Figura 40).

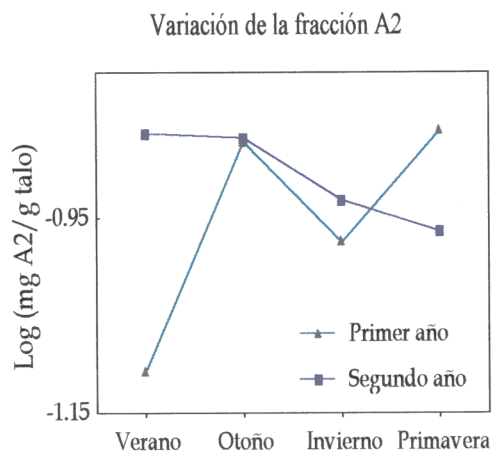


Figura 40. Variaciones de la fracción A2 en los meses de recogida de las muestras. En todos los casos, se muestran los valores medios.

La comparación de los pesos de la fracción A1 entre estaciones resultó estadísticamente significativa (ANOVA: $F_{3,16}=3,803$; $p<0,031$). El patrón de variación fue contrario al de A2.

4.2.5.2. Variación de las fracciones extraídas con álcali (F1S y F1I)

El peso de la fracción F1S no pareció variar ni estacional ni anualmente (Tabla 38).

Fracción F1S			
Factor	F	g. l.	p
Estación	2,114	3,15	0,141
Año	0,017	1,15	0,899
Interacción	8,332	3,15	0,002*

Tabla 38. Resultados del ANCOVA de la fracción F1S. Covariante: fracción F0. Con asterisco y en negrita se resaltan los resultados significativos.

El término interacción sí resultó significativo por lo que las variaciones de los niveles de un factor no fueron homogéneas a través de los niveles del otro (Figura 41)

Al contrario que en la fracción anterior, los pesos de la fracción **F1I** sí difirieron estacional y anualmente. En este ANCOVA se empleó como covariante **F0**. Los resultados se muestran en la Tabla 39.

Fracción F1I			
Factor	F	g. l.	p
Estación	14.805	3,15	<0,000*
Año	10,751	1,15	0,003*
Interacción	2.664	3,15	0,065

Tabla 39. Resultados del ANCOVA de la fracción **F1I**. Como covariante se empleó **F0**. Con asterisco y en negrita se resaltan los resultados significativos.

El patrón de variación estacional fue semejante durante los dos años (Figura 41). En Verano se obtuvieron los valores mínimos, aumentando progresivamente en Otoño e Invierno y cayendo bruscamente de nuevo en la Primavera.

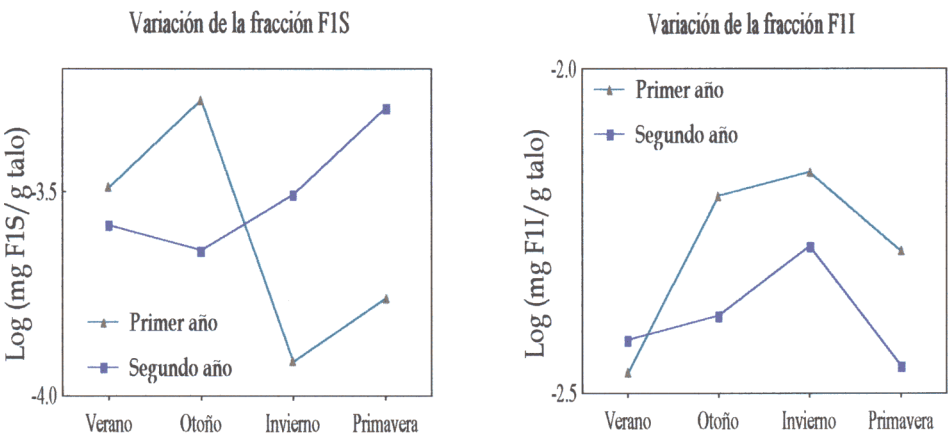


Figura 41. Variaciones de las fracciones **F1S** (gráfico de la izquierda) y **F1I** (gráfico de la derecha) en los dos años de muestreo. En todos los casos, se muestran los valores medios.

4.1.5.3. Análisis del residuo **F2**

Respecto a la fracción **F2**, se obtuvieron diferencias estacionales y anuales (Tabla 40).

Fracción F2		
Factor	F	p
Estación	12.427	<<0,001*
Año	40,530	<<0,001*
Interacción	5.933	<0,006*

Tabla 40. Resultados del ANOVA de la fracción F2. Con asterisco y en negrita se resaltan los resultados significativos.

Empleando como covariantes todas las demás fracciones se obtuvieron resultados similares. La variabilidad estacional observada para esta fracción (Figura 42) fue similar al patrón encontrado para esta misma fracción en *P. furfuracea* (mayor peso en Otoño, disminución progresiva en Invierno y Primavera y ligero aumento en Verano).

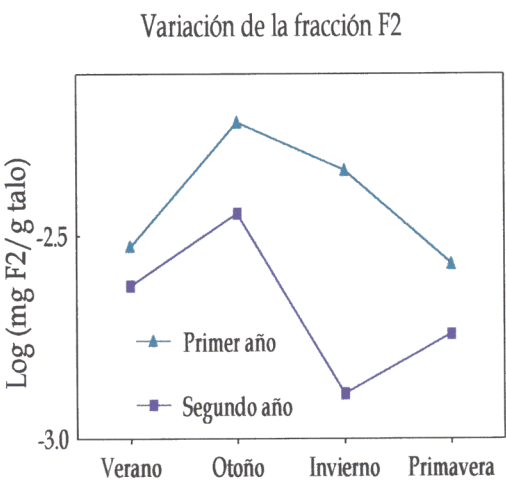


Figura 42. Variaciones de la fracción F2 en los meses de recogida de las muestras. En todos los casos, se muestran los valores medios.

4.3.Estudio cualitativo estacional en la fracción F1Sde *L. pustulata*.

Como se puede observar en la figura 43, la filtración en gel de intercambio iónico del conjunto de polisacáridos no dio un perfil significativamente diferente en cada estación. También se filtraron las muestras correspondientes a

los meses restantes del muestreo, dando un perfil similar. La composición de monosacáridos de estas fracciones, como se muestra en la Tabla 41, también resultó semejante a lo largo del año de estudio. Los rendimientos de las fracciones también fueron parecidos (Tabla 41).

La purificación con propanol rindió porcentajes comparables de polisacáridos y los porcentajes se muestran en la Tabla 42. En la Figura 44 se puede apreciar que los espectros de ^1H -RMN de la fracción F1Sn PP son prácticamente idénticos, lo que se corresponde con una composición semejante. Esto mismo ocurrió con la fracción F1Sg PP. Sin embargo los porcentajes de metilación de las fracciones resultaron algo diferentes para cada estación debido a que es un polisacárido bastante ramificado y a veces, la metilación no fue completa, no pudiéndose comparar los resultados. Las repeticiones no se realizaron por escasez de muestra.

Monosacárido	Invierno de 1998			Primavera de 1998		
	F1Sn	F1Sg	F1S I	F1Sn	F1Sg	F1S I
	33%	23%	11%	37%	26%	11%
Arabinosa	-	-	-	1	1	-
Ramnosa	5	3	-	5	2	1
Xilosa	2	2	-	2	-	-
Manosa	63	61	11	54	53	12
Galactosa	28	26	5	33	31	7
Glucosa	4	8	16	5	13	28
Total	100	100	32	100	99	48
Monosacárido	Verano de 1998			Otoño de 1998		
	F1Sn	F1Sg	F1S I	F1Sn	F1Sg	F1S I
	29%	30%	13%	30%	27%	12%
Arabinosa	-	-	-	-	1	-
Ramnosa	9	3	1	7	5	-
Xilosa	2	-	-	1	1	-
Manosa	52	60	13	56	55	11
Galactosa	31	26	7	28	30	5
Glucosa	6	10	32	8	8	35
Total	100	99	54	100	100	52

Tabla 41: Porcentajes de los monosacáridos de las fracciones filtradas de cada estación del año.

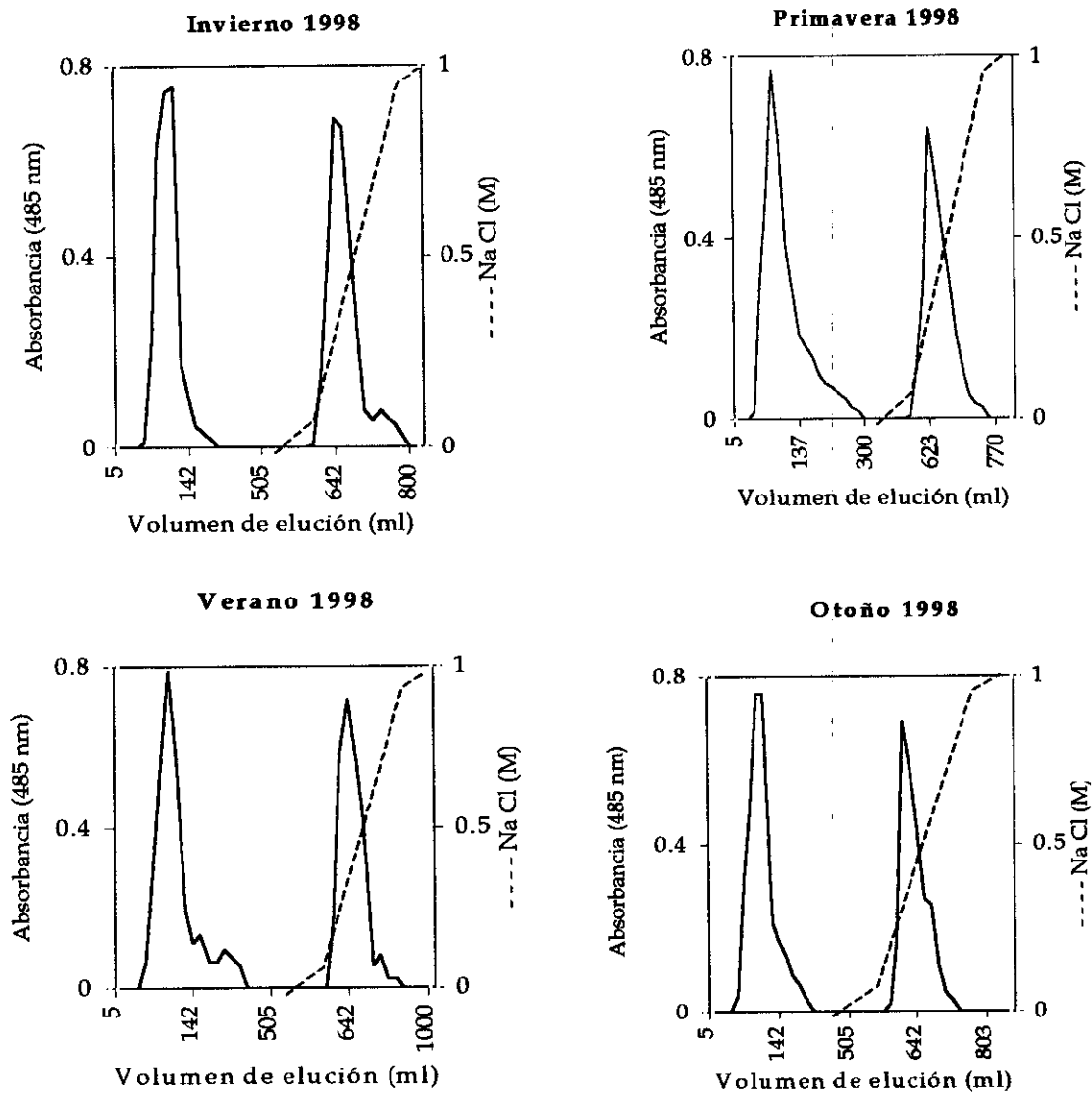


Figura 43: Filtración en gel de intercambio iónico DEAE Sepharose CL 6B de las fracciones F1S recolectadas en verano, otoño, invierno y primavera de 1998.

	Invierno de 1998		Primavera de 1998	
	Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante	Precipitado
F1Sn	47	36	45	28
F1Sg	32	29	32	27

	Verano de 1998		Otoño de 1998	
	Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante	Precipitado
F1Sn	50	21	40	28
F1Sg	42	39	40	33

Tabla 42. Porcentajes de los polisacáridos aislados mediante precipitación con 2-propanol respecto a su fracción correspondiente, F1Sn ó F1Sg.

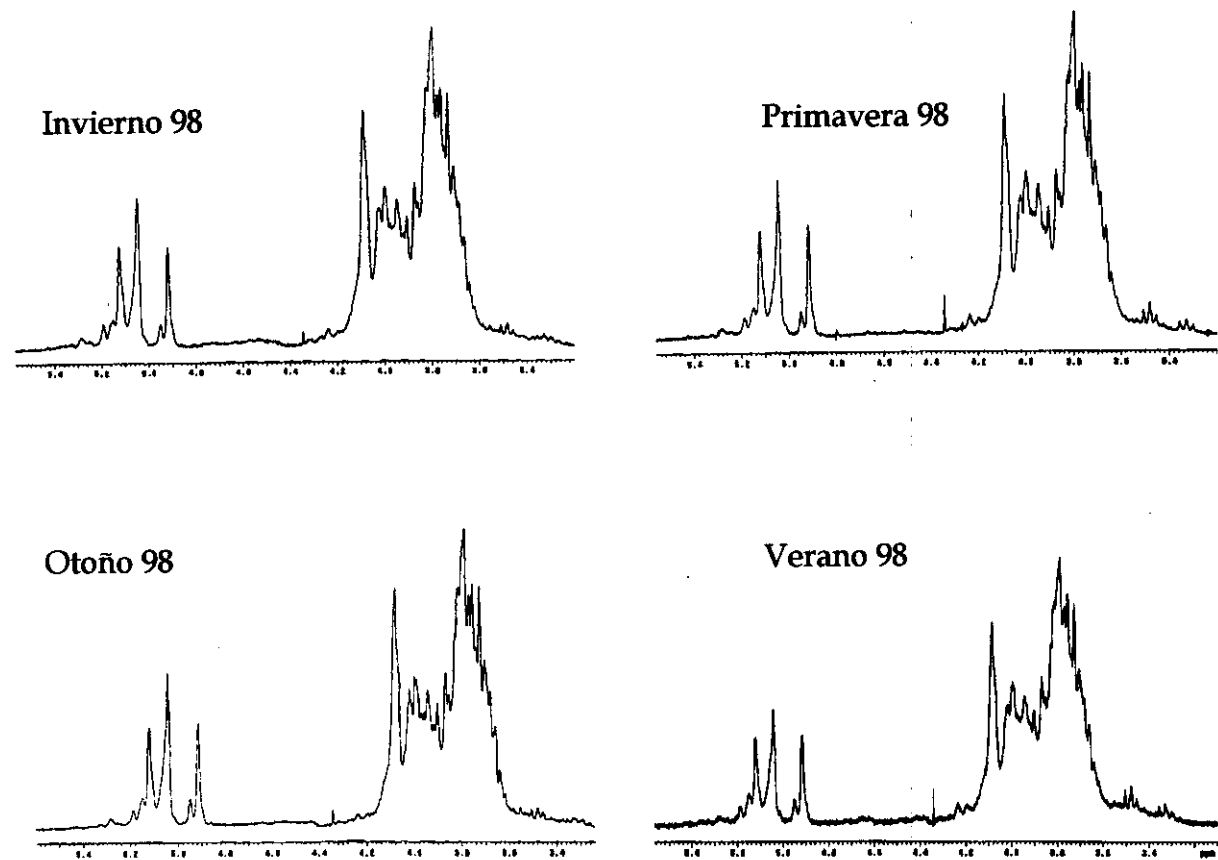


Figura 44. Espectros de ¹H-RMN de la fracción F1Sn PP aislada del talo en cuatro periodos del año diferentes, Invierno, Primavera, Verano y Otoño.

4.4. Pesos de las fracciones y datos de las variables meteorológicas.

mg fracción/g talo seco

A1								
<i>P. furfuracea</i>								
Localidad	Verano 97	Otoño 97	Invierno 98	Primavera98	Verano 98	Otoño 98	Invierno 99	Primavera99
Valsaín	0,215	0,138	0,152	0,09	0,135	0,109	0,146	0,065
Valsaín	0,2	0,149	0,111	0,086	0,132	0,116	0,08	0,085
Valsaín	0,169	0,116	0,123	0,087	0,133	0,087	0,114	0,085
Pradillo	0,196	0,152	0,089	0,102	0,104	0,113	0,117	0,095
Pradillo	0,164	0,223	0,077	0,113	0,105	0,119	0,129	0,118
Pradillo		0,173	0,098	0,095		0,08	0,139	0,078
<i>L. pustulata</i>								
El Escorial	0,047	0,037	0,043	0,03	0,052	0,038	0,038	0,046
El Escorial	0,036	0,031	0,038	0,031	0,036	0,023	0,037	0,041
El Escorial	0,034	0,023	0,04	0,036	0,034	0,045	0,037	0,04

mg fracción/g talo seco

F0		<i>P. furfuracea</i>						
Localidad	Verano 97	Otoño 97	Invierno 98	Primavera98	Verano 98	Otoño 98	Invierno 99	Primavera99
Valsaín	0,063	0,046	0,032	0,025	0,023	0,034	0,014	0,031
Valsaín	0,068	0,042	0,022	0,033	0,025	0,031	0,024	0,029
Valsaín	0,092	0,036	0,018	0,025	0,024	0,028	0,029	0,04
Pradillo	0,022	0,052	0,019	0,022	0,01	0,024	0,021	0,026
Pradillo	0,028	0,032	0,015	0,016	0,012	0,018	0,022	0,026
Pradillo	0,025	0,045	0,014	0,019	0,02	0,024	0,015	0,034
		<i>L. pustulata</i>						
El Escorial	0,029	0,025	0,032	0,015	0,038	0,021	0,033	0,033
El Escorial	0,023	0,042	0,026	0,019	0,036	0,022	0,029	0,026
El Escorial	0,027	0,023	0,037	0,024	0,033	0,025	0,037	0,029

mg fracción/g talo seco

A2		<i>P. furfuracea</i>						
Localidad	Verano 97	Otoño 97	Invierno 98	Primavera98	Verano 98	Otoño 98	Invierno 99	Primavera99
Valsaín	0,143	0,106	0,145	0,207	0,223	0,183	0,213	0,196
Valsaín	0,136	0,102	0,145	0,202	0,221	0,203	0,229	0,201
Valsaín	0,141	0,105	0,149	0,207	0,232	0,199	0,227	0,201
Pradillo	0,16	0,16	0,156	0,184	0,218	0,163	0,192	0,239
Pradillo	0,155	0,155	0,171	0,193	0,218	0,18	0,215	0,2
Pradillo		0,165	0,17	0,18	0,228	0,168	0,202	0,231
		<i>L. pustulata</i>						
El Escorial	0,384	0,438	0,364	0,425	0,43	0,421	0,408	0,392
El Escorial	0,33	0,424	0,369	0,423	0,422	0,425	0,394	0,359
El Escorial	0,284	0,394	0,4	0,421	0,414	0,414	0,38	0,394

A2S		<i>P. furfuracea</i>						
Localidad	Verano 97	Otoño 97	Invierno 98	Primavera98	Verano 98	Otoño 98	Invierno 99	Primavera99
Valsaín	0,026	0,004	0,016	0,022	0,044	0,024	0,027	0,056
Valsaín	0,018	0,008	0,016	0,043	0,045	0,033	0,057	0,065
Valsaín	0,12	0,007	0,015	0,031	0,025	0,029	0,055	0,036
Valsaín	0,014	0,01	0,016	0,044	0,042	0,021	0,031	0,076
Pradillo	0,014	0,017	0,02	0,024	0,029	0,021	0,033	0,039
Pradillo	0,028	0,013	0,021	0,04	0,045	0,022	0,045	0,033
Pradillo	0,023	0,021	0,011	0,016	0,031	0,022	0,048	0,024
Pradillo	0,021	0,024	0,02	0,021	0,026	0,018	0,024	0,035
A2I		<i>P. furfuracea</i>						
Localidad	Verano 97	Otoño 97	Invierno 98	Primavera98	Verano 98	Otoño 98	Invierno 99	Primavera99
Valsaín	0,1	0,083	0,115	0,173	0,156	0,137	0,172	0,139
Valsaín	0,109	0,082	0,113	0,145	0,138	0,167	0,156	0,134
Valsaín	0,121	0,079	0,119	0,162	0,178	0,162	0,144	0,161
Valsaín	0,1	0,083	0,122	0,15	0,147	0,144	0,165	0,130
Pradillo	0,132	0,117	0,131	0,156	0,167	0,117	0,149	0,179
Pradillo	0,11	0,127	0,141	0,141	0,173	0,138	0,166	0,162
Pradillo	0,118	0,121	0,155	0,161	0,18	0,128	0,143	0,182
Pradillo	0,124	0,122	0,113	0,153	0,183	0,133	0,139	0,194

mg fracción/g talo seco

F1		<i>P. furfuracea</i>						
Localidad	Verano 97	Otoño 97	Invierno 98	Primavera98	Verano 98	Otoño 98	Invierno 99	Primavera99
Valsaín	0,106	0,135	0,177	0,132	0,143	0,156	0,162	0,169
Valsaín	0,1	0,135	0,172	0,134	0,126	0,157	0,16	0,166
Valsaín	0,097	0,137	0,156	0,132	0,126	0,155	0,158	0,171
Pradillo	0,117	0,164	0,156	0,134	0,136	0,167	0,15	0,152
Pradillo	0,112	0,15	0,201	0,123	0,123	0,162	0,163	0,152
Pradillo		0,145	0,153	0,135	0,138	0,152	0,152	0,144
		<i>L. pustulata</i>						
El Escorial	0,133	0,143	0,142	0,133	0,129	0,126	0,147	0,118
El Escorial	0,134	0,159	0,135	0,11	0,126	0,135	0,131	0,151
El Escorial	0,13	0,149	0,135	0,124	0,126	0,135	0,14	0,145

mg fracción/g talo seco

F1S	<i>P. furfuracea</i>							
Localidad	Verano 97	Otoño 97	Invierno 98	Primavera98	Verano 98	Otoño 98	Invierno 99	Primavera99
Valsaín	0,059	0,060	0,041	0,069	0,078	0,062	0,056	0,051
Valsaín	0,061	0,059	0,047	0,068	0,080	0,050	0,060	0,042
Valsaín	0,060	0,054	0,057	0,076	0,083	0,079	0,055	0,063
Valsaín	0,057	0,065	0,055	0,072	0,085	0,069	0,048	0,043
Valsaín	0,056	0,062	0,065	0,067	0,085	0,059	0,068	0,060
Pradillo	0,063	0,091	0,046	0,072	0,078	0,101	0,053	0,076
Pradillo	0,066	0,071	0,045	0,072	0,075	0,077	0,063	0,065
Pradillo	0,069	0,074	0,052	0,072	0,078	0,078	0,072	0,062
Pradillo	0,067	0,079	0,046	0,077	0,073	0,080	0,075	0,074
Pradillo	0,063	0,074	0,064	0,072	0,073	0,086	0,058	0,062
<i>L. pustulata</i>								
El Escorial	0,035	0,036	0,02	0,024	0,025	0,024	0,028	0,039
El Escorial	0,036	0,048	0,025	0,032	0,031	0,024	0,032	0,032
El Escorial	0,027	0,035	0,022	0,023	0,025	0,028	0,032	0,049
El Escorial	0,029	0,036	0,018	0,022	0,026	0,035	0,03	0,032
El Escorial	0,027	0,037	0,016	0,017	0,033	0,021	0,027	0,035

mg fracción/g talo seco

F1I		<i>P. furfuracea</i>						
Localidad	Verano 97	Otoño 97	Invierno 98	Primavera98	Verano 98	Otoño 98	Invierno 99	Primavera99
Valsaín	0,040	0,045	0,094	0,045	0,059	0,081	0,097	0,107
Valsaín	0,039	0,050	0,099	0,045	0,053	0,095	0,092	0,114
Valsaín	0,040	0,055	0,097	0,038	0,054	0,065	0,104	0,103
Valsaín	0,038	0,057	0,107	0,035	0,051	0,078	0,102	0,128
Valsaín	0,039	0,055	0,099	0,042	0,053	0,084	0,082	0,112
Pradillo	0,035	0,069	0,096	0,038	0,047	0,052	0,083	0,067
Pradillo	0,035	0,069	0,100	0,041	0,052	0,069	0,073	0,063
Pradillo	0,044	0,066	0,088	0,045	0,048	0,058	0,079	0,071
Pradillo	0,040	0,066	0,103	0,040	0,044	0,061	0,080	0,056
Pradillo	0,045	0,070	0,076	0,045	0,049	0,060	0,091	0,069
		<i>L. pustulata</i>						
El Escorial	0,079	0,116	0,121	0,108	0,097	0,096	0,099	0,074
El Escorial	0,084	0,111	0,114	0,098	0,088	0,084	0,099	0,1
El Escorial	0,091	0,107	0,112	0,101	0,083	0,098	0,111	0,085
El Escorial	0,094	0,105	0,115	0,089	0,094	0,1	0,093	0,078
El Escorial	0,092	0,105	0,111	0,082	0,095	0,109	0,11	0,071

mg fracción/g talo seco

F2		<i>P. furfuracea</i>						
Localidad	Verano 97	Otoño 97	Invierno 98	Primavera98	Verano 98	Otoño 98	Invierno 99	Primavera99
Valsaín	0,146	0,242	0,167	0,151	0,149	0,184	0,16	0,153
Valsaín	0,152	0,249	0,163	0,154	0,171	0,178	0,173	0,16
Valsaín	0,141	0,383	0,178	0,16	0,171	0,177	0,181	0,179
Pradillo	0,154	0,242	0,221	0,193	0,181	0,206	0,222	0,201
Pradillo	0,163	0,195	0,243	0,193	0,172	0,216	0,203	0,206
Pradillo		0,282	0,226	0,192	0,174	0,225	0,199	0,225
		<i>L. pustulata</i>						
El Escorial	0,07	0,108	0,102	0,077	0,072	0,085	0,054	0,067
El Escorial	0,087	0,1	0,098	0,076	0,069	0,096	0,047	0,058
El Escorial	0,084	0,119	0,09	0,077	0,077	0,08	0,068	0,069

<i>P. furfuracea</i> Medias trimestrales					
Estaciones/población		Primer año (97-98)		Segundo año (98-99)	
		T (°C)	Precipitación (mm³)	T (°C)	Precipitación (mm³)
Verano	Valsaín	13,4	646,3	16,6	323,6
	Pradillo	16,3	441,3	17,8	327,6
Otoño	Valsaín	8,6	2011,6	7	1262
	Pradillo	12	1686	10	609,3
Invierno	Valsaín	1,5	2839	0	877,3
	Pradillo	5	1239	3	894,6
Primavera	Valsaín	4	1563	4,7	948,3
	Pradillo	8,7	1164	8,5	862

Días por trimestre				
Estaciones	Días de niebla			
	Primer año (97-98)		Segundo año (98-99)	
	Valsaín	Pradillo	Valsaín	Pradillo
Verano	35	0	15	0
Otoño	48	0	50	0
Invierno	63	0	50	3
Primavera	56	0	48	1

<i>Lasallia pustulata</i> Medias trimestrales				
Estaciones	Primer año (97-98)		Segundo año (98-99)	
	°C	mm³	°C	mm³
Verano	-	-	22,5	153,3
Otoño	-	-	12,4	332,3
Invierno	7,1	515	3,9	326
Primavera	10,6	978,3	10,4	558,6

DISCUSIÓN

1. FRACCIONAMIENTO DE LOS POLISACÁRIDOS DEL TALO

La composición y porcentaje de los polisacáridos de un talo liquénico puede ser de utilidad a la hora de establecer similitudes y diferencias entre estos organismos y su estudio podría llegar a ser fundamental en el conocimiento de una parte del metabolismo de los hongos liquenizados que sintetizan estas moléculas tan características. En el presente trabajo se han separado y purificado varias fracciones, cuya proporción y composición variaba según la familia a la que pertenece el líquen estudiado. El estudio de los componentes mayoritarios de cada fracción nos puede dar una idea de la composición general de los polisacáridos del talo y de cómo podrían disponerse en él.

Mediante el tratamiento con agua caliente se logró extraer, en diferentes cantidades según la familia, polisacáridos con una elevada proporción de glucosa que, al ser tratados con etanol, precipitaban y se separaban de glicoproteínas (Bubrik *et al.*, 1985) y lípidos (Dembitsky *et al.*, 1991) (fracción A1). En función de su solubilidad en agua fría se separaron en todos los casos dos fracciones, A2S y A2I. Estos polisacáridos eran glucanos que presentaban diferentes estructuras en las especies de distintas familias, e incluso de distintos géneros, y podrían ser marcadores quimiotaxonómicos como los propuestos por Common (1991) para la familia Parmeliaceae. Tras el tratamiento con agua caliente, la estructura del talo no se alteró, manteniendo éste el mismo aspecto externo. Esto podría indicar que estos polisacáridos, que se extraen fácilmente de los talos, son extracelulares o están débilmente ligados a la pared. Se ha sugerido (Gorin *et al.*, 1988) que polisacáridos de este tipo como el pustulano, que puede representar hasta un 40% de los polisacáridos totales aislados de *L. pustulata*, tienen una función de reserva y de protección frente a cambios ambientales y no son de carácter estructural.

Al extraer con álcali se obtuvieron varios polisacáridos con mayor contenido en manosa y galactosa, que quizá tengan una disposición más interna en la pared celular (Boissière, 1987). En la familia Cladoniaceae al mostrarse fuertemente agregados, fue necesario una extracción con NaOH a 120°C para liberar los heteropolisacáridos (fracción F1 1S), constituyentes mayoritarios de

la pared. En todos los casos se separó una pequeña proporción (menor del 10%) de una fracción soluble en agua fría (F1S) cuyos componentes serán discutidos posteriormente, y una insoluble (F1I) cuya composición será analizada en el siguiente apartado.

Se denominó fracción F2 al residuo de todas las extracciones anteriores. Su hidrólisis reveló la presencia de monómeros neutros que probablemente provinieran de restos de polisacáridos aislados anteriormente y del complejo glucano quitina que es uno de los polímeros más ampliamente descritos en las paredes celulares fúngicas (Sietsma y Wessels, 1977). En el extremo de esta situación resultó estar la fracción F2 de la familia Cladoniaceae. La alta proporción de los monosacáridos neutros manosa y galactosa volvió a indicar una gran abundancia de heteropolisacáridos.

1.1. Purificación y análisis de los polisacáridos aislados

El análisis general de la fracción soluble en agua fría (A2S) en las dos especies de la familia Parmeliaceae (Tabla 3), demostró que contenía glucosa como principal componente, pero además se detectaron manosa, (12%) y galactosa (9-11%). Por ello se sospechó que existía una mezcla de polisacáridos y se trató el material con licor de Fehling, precipitando (A2S PC) una pequeña cantidad de un α -(1 \rightarrow 6)-manano ramificado, cuyas cadenas laterales contenían principalmente, α -(1 \rightarrow 3) glucosa y galactopiranos terminal. El componente mayoritario, que no precipitaba (A2S SC), contenía un α glucano lineal de alto Pm, con enlaces (1 \rightarrow 3) y (1 \rightarrow 4) en proporción 2:1, similar al descrito como isoliquenano por algunos autores (Kramer, *et al.*, 1995, Gorin y Iacomini, 1984). A veces la purificación del isoliquenano puede no ser total, puesto que los heteropolisacáridos minoritarios se separan de él con dificultad, incluso después de realizar fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular. Diversos autores describen la presencia de isoliquenano en talos de la familia Parmeliaceae, pero la proporción de enlaces (1 \rightarrow 3) y (1 \rightarrow 4) detectada por cada uno de ellos es variable. Si no se ha realizado una cuidadosa purificación de este polisacárido, puede ocurrir que en realidad se esté analizando una mezcla

de polímeros y que éste sea el origen de la heterogeneidad del isoliquenano al consultar distintas fuentes. (Chanda *et al.* 1957, Fleming y Manners, 1966)

En la familia Umbilicariaceae, la fracción A2S no contenía isoliquenano, sino un $\beta(1\rightarrow6)$ -glucano mayoritario parcialmente acetilado y otros heteropolisacáridos. La ausencia de isoliquenano y la presencia de $\beta(1\rightarrow6)$ -glucano en los líquenes de esta familia ha sido descrita exhaustivamente por Nauri *et al.* en 1999. El grado de acetilación del 15% encontrado también es similar al descrito por otros autores (Nishikawa *et al.* 1969).

En la familia Cladoniaceae, la fracción A2S representó un porcentaje muy bajo (aproximadamente el 1% del talo) y en su análisis de metilación se detectaron los derivados de (1 \rightarrow 3)-glucopiranososa y de (1 \rightarrow 6)-manopiranososa. Debido a el poco material aislado, por el momento no se ha determinado si corresponde a un solo polisacárido o a varios.

El glucano insoluble en agua fría (A2I), que en todos los casos se encuentra presente en mayor proporción que el soluble, fue el componente mayoritario en el talo de las familias Umbilicariaceae y Parmeliaceae (Figuras 9y 20).

En la fracción A2I de la familia Parmeliaceae se identificó al menos un glucano insoluble diferente para cada especie. El de *Platismatia glauca* se aisló de forma mayoritaria en la fracción A2I *b*, resultando ser un polisacárido con enlaces $\alpha(1\rightarrow3)$ -(1 \rightarrow 4) en proporciones 1:2. Éstas fueron inversas a las del polisacárido de la fracción soluble A2S y no coincidieron con las de otros α -glucanos descritos en la literatura como el evernano, PC-3, nigerano, etc (Yokota *et al.* 1979, Takeda *et al.* 1970). Esto también fue corroborado por los análisis de degradación de Smith, en los que se obtuvo un porcentaje mayor de eritritol, proveniente de la degradación de los enlaces (1 \rightarrow 4), que en la fracción análoga de *P. furfuracea*. La fracción A2I *c* fue minoritaria y sus principales tipos de enlace, detectados mediante análisis de metilación, fueron (1 \rightarrow 3) y (1 \rightarrow 4)-glucopiranososa en proporción (2:1), por lo que podríamos aventurar que se trata de liquenano, ya que además es insoluble en agua fría. En *P. furfuracea*, la fracción A2I *b* fue minoritaria y su espectro de ^1H -RMN mostró señales

características de enlaces α y β , que coincidían con las del espectro registrado por Kramer *et al.* (1995) para una mezcla de liquenano e isoliquenano. En el polisacárido de la fracción mayoritaria A2I *c*, tanto la proporción 2:1 de los enlaces (1→3)-(1→4) (Tabla) como su insolubilidad en agua fría, corresponden a lo descrito para el liquenano (Chanda *et al.*, 1951).

En las 4 especies de la familia Umbilicariaceae, prácticamente todo el polisacárido insoluble de la fracción A2I era un β -(1→6) glucano parcialmente acetilado, que ha sido descrito en numerosos hongos liquenizados de esta familia (Nauri *et al.* en 1999). Este polímero se extrajo con agua caliente y sólo una pequeña proporción del mismo, que quizá contenga las cadenas de menor tamaño, fue soluble en agua fría y se detectó en la fracción A2S.

En la familia Cladoniaceae, la fracción A2I representó un porcentaje muy bajo del peso seco del talo, pero se consiguió purificar en la fracción A2I *c* un glucano tipo nigerano, con enlaces α -(1→3)-(1→4) y ramificado en O-3 y en O-2. Este polisacárido había sido descrito como componente de algunas especies de esta familia por Nishikawa *et al.* en 1974, aunque no buscaron las ramificaciones.

Otro de los componentes aislados en proporción abundante de los talos estudiados, fue la fracción FII (soluble en álcali e insoluble en agua), cuya composición también resultó diferente para cada familia estudiada.

En la familia Parmeliaceae, al tratar con álcali y dializar la fracción FII, se separaron varias fracciones pero sólo el residuo (FII *a*) fue el componente mayoritario. Este residuo (aproximadamente 65% de la fracción FII) parecía estar compuesto por agregados de polisacáridos de pared celular con residuos de (1→3)-glucopiranososa (Tabla 9), muy abundantes en *P. furfuracea*, y además galactopiranososa terminal y manosa con uniones (1→2,4,6). Las fracciones minoritarias (24-16%) FII *b* y FII *c* parecían contener un material de composición semejante a los glucanos de las fracciones A2I *b* y A2I *c* respectivamente. Esto podría indicar que el agua caliente no bastó para extraer totalmente dichos glucanos y que quizá aquella parte, que se encontraba más

hacia el interior de la pared celular, se extrajo posteriormente con el tratamiento alcalino.

En la fracción F1I de la familia Umbilicariaceae después del nuevo tratamiento con álcali y diálisis, se logró obtener una fracción mayoritaria (73-64% de F1I), denominada F1I *c* que coincide con la aislada por Boissière (1987) y descrita como componente estructural de la pared del hongo. Contenía principalmente β -(1→6) y β -(1→3)-glucanos, excepto en *U. crustulosa* en la que sólo se obtuvo β -(1→3)-glucano. Esta diferencia en composición podría reflejar diferencias ecomorfológicas de esta especie cuyo estudio podría ser interesante. También se separaron galactomananos (F1I *b*) y un residuo no polisacárido (F1I *a*). Posteriormente, al tratar F1I *c* con agua caliente, se logró solubilizar una fracción con mayoría de enlaces de glucopiranososa β -(1→6) mientras que los β -(1→3) permanecían insolubles. Como en el caso anterior, quizá la extracción con agua caliente no bastó para obtener la totalidad de los glucanos β -(1→6) (de A2I) y aquella parte que se encontraba más hacia el interior de la pared celular, se extrajo posteriormente con el tratamiento alcalino. Las ramificaciones de glucosa β -(1→3,6) encontradas por Sone *et al.* (1996) en *Gyrophora esculenta* en este caso no se detectaron, aunque no se descarte su existencia en proporciones muy pequeñas.

En la familia Cladoniaceae se logró aislar un polisacárido minoritario (11-26% de F1I) en la fracción F1I *c* similar al nigerano de la fracción A2I *c*. La fracción más abundante (63-76% de F1I) fue el residuo F1I *a* pero, al igual que la fracción A2I *a*, no contenía apenas monosacáridos neutros y su espectro de IR no aportó más información, no llegándose a conocer por el momento su composición.

En la fracción F2, para deshacer el complejo glucano quitina y además eliminar el polisacárido restante, se realizó una hidrólisis parcial, algo más fuerte en el caso de *C. rangiformis*, que permitió obtener, además del glucano característico (F2I *b*), una fracción (F2I *a*) con un espectro de IR que mostraba bandas típicas de la quitina (Michel y Scurfield, 1970) (Figuras 10, 22 y 31).

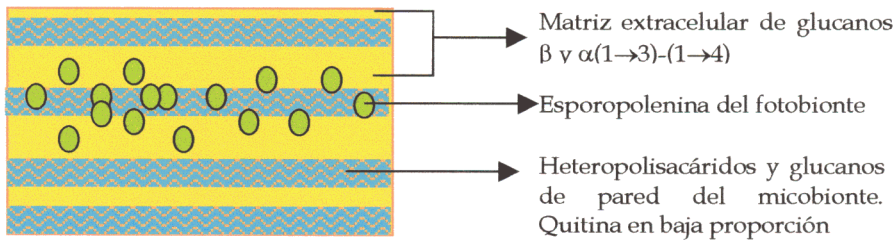
En todas las especies estudiadas el porcentaje de glucano (fracción F2I b) aislado fue entre un 1 y un 4% del talo, aunque puede estar minusvalorado por que en el proceso de hidrólisis el polisacárido se ha podido degradar parcialmente, dando lugar a cadenas cortas que no precipitaron con etanol y por tanto no fueron cuantificadas.

Posteriormente, se valoró la concentración de glucosamina en las fracciones F2I a de *P. furfuracea* y *L. pustulata*, correspondiente a el porcentaje de quitina del hongo. En los dos casos resultó ser inferior al 1% del talo (0,8 y 0,6% respectivamente). Esta proporción podría estar minusvalorada ya que Honegger y Bartnicki-García, (1991) han detectado proporciones de 3-7% en cultivos del micobionte en varias especies. Por otra parte, se ha descrito que el acúmulo de quitina en el hongo se produce preferentemente en unas estructuras globosas de las hifas y disminuye su proporción al envejecer (Galun, *et al.* 1976). En los talos, la proporción de hifas jóvenes sería escasa frente al resto y por esta razón parece normal el bajo % de quitina detectado.

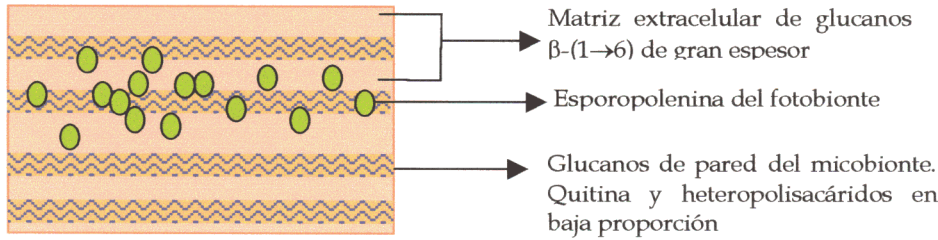
El pigmento oxidado residual (F2I aI) fue resistente a varias hidrólisis e insoluble en sosa. Su espectro de IR, similar al encontrado por Honegger y Brunner, (1981) en *Coccomyxa*, junto a las propiedades descritas nos llevó a pensar que se trataba de un compuesto tipo esporopolenina, un polímero carotenoide, componente de paredes celulares de hongos (Gooday *et al.*, 1973), polen (Southworth, 1974) y determinadas algas (Honegger y Brunner, 1981). El análisis elemental de esta fracción rindió una fórmula semejante en los dos casos (ver Resultados 1.4 y 2.4) y parecida a la descrita para este polímero por otros autores (Gooday *et al.*, 1973) excepto en el porcentaje de nitrógeno. Éste puede proceder de otros componentes residuales, como la quitina, y por tanto puede indicar algo de heterogeneidad de la muestra. El polímero tipo esporopolenina está caracterizado en las algas libres del género *Trebouxia* (Koning y Peveling 1984), que son el fotobionte en estos dos casos estudiados, pero existen pocos datos sobre la estructura de la pared del alga en simbiosis. Con los indicios aquí mostrados, podemos proponer que el residuo aislado sea dicho componente estructural.

De forma ilustrativa y sólo orientativa, los polisacáridos descritos en este estudio se podrían disponer en el talo de la siguiente forma (Figura 45).

Familia Parmeliaceae



Familia Umbilicariaceae



Familia Cladoniaceae

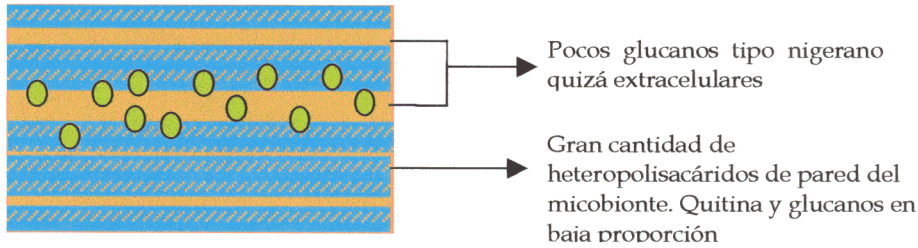


Figura 45. Representación idealizada de un corte transversal de un talo de las especies estudiadas, en base a las proporciones de polisacáridos obtenidas. El micobionte es representado con rectángulos y con círculos, el fotobionte. En tonos ocres se representan los glucanos característicos de cada familia (o género) y en azul los heteropolisacáridos.

2. FRACCIÓN EXTRAÍDA CON ÁLCALI Y SOLUBLE EN AGUA

La fracción de la pared celular extraída con álcali y soluble en agua contiene polisacáridos que han sido empleados como marcadores quimiotaxonómicos

(Leal y Bernabé, 1998, Domenech, 1999, Ahrazem, 2000). Los hongos estudiados por estos autores pertenecen a los ordenes Hypocreales y Eurotiales y por lo general en dicha fracción sólo se encuentra un tipo de polisacárido cuya estructura está correlacionada con la evolución de los distintos géneros. En ocasiones, este polisacárido característico puede extraerse junto con un α -(1 \rightarrow 4)-glucano, pero éste es separado mediante cromatografía de filtración en gel. La filtración en gel de las fracciones extraídas con álcali y solubles en agua de los líquenes estudiados, demostró que en este material no hay sólo un tipo de polisacárido y tampoco permitió conseguir una buena separación de los mismos.

Los estudios estructurales realizados con polisacáridos de líquenes se basan principalmente en polisacáridos precipitados con solución de Fehling. Empleando dichas técnicas, se obtuvo cierta separación (excepto en las dos especies de *Umbilicaria* en las que no hubo precipitado), lo que nos indicó la existencia de al menos dos estructuras de polisacáridos diferentes. Sin embargo los resultados obtenidos no fueron del todo concluyentes porque las muestras seguían siendo heterogéneas, como revelaron los análisis de ^1H -RMN y metilación de las fracciones eluidas en cromatografía de exclusión molecular.

Mediante cromatografía de intercambio iónico de la fracción, F1S, se pudo separar al menos dos fracciones (*neutra* y *gradiente*) de composición heterogénea. Como alternativa a la purificación con cobre se empleó el 2-isopropanol lográndose separar dos nuevas fracciones en todos los casos (PP y SP) que, en general, parecían estar compuestas por un solo tipo de polisacárido. Los efectos de este solvente orgánico, actualmente estudiado en varios campos (Gaudiano, MC, 1999), son atribuidos a una bajada de la constante dieléctrica y a una interacción mediante puentes de hidrógeno que, en el caso descrito de las proteínas, incrementaría la estructura en α hélice. Estas interacciones, en el caso de los polisacáridos, pueden ser similares a las establecidas con el cobre del licor de Fehling en los aquellos polímero con enlaces (1 \rightarrow 6) o que tengan estructuras similares y por ello los resultados obtenidos fueron comparables. En casi la totalidad de los casos estudiados, **polisacáridos precipitados** por este

método (PP), tuvieron una composición similar a los precipitados con licor de Fehling (PC), pero se obtuvieron de forma más sencilla y sin interferencias de iones Cu que pudieran afectar en el análisis de la muestra.

En la familia Parmeliaceae se separó una fracción *neutra*, minoritaria, de composición heterogénea y una fracción *gradiente*, mayoritaria, que eluyó en tres picos. Al añadir propanol, en la fracción *neutra* se obtuvo un pequeño precipitado cuya metilación rindió gran variedad de residuos entre los cuales se detectó $\rightarrow 3$ -Glc p -(1 \rightarrow y $\rightarrow 4$)-Glc p -(1 \rightarrow . Por ello se pensó que era una mezcla de polisacáridos y dado su pequeño porcentaje se descartó su estudio. Los precipitados (PP) de la fracción *gradiente* fueron mayoritarios y en los tres picos se observó que los tipos residuos eran similares pero su abundancia variaba. En el primer pico (F1Sg(1) PP), la escasez de ácido glucurónico hallado en *P. glauca* hizo que su espectro de ^1H -RMN fuera más simple por lo que se eligió para la interpretación de su estructura básica.

En el sobrenadante de estas fracciones se detectaron otros residuos con abundancia de $\rightarrow 1$ -Gal f -($\rightarrow 5$ y $\rightarrow 1$)-Gal f -($\rightarrow 3$ que podrían pertenecer a un polisacárido relacionado con el galactofurano aislado en el primer pico eluido de la columna de exclusión molecular de la fracción F1S SC. Debido a la facilidad con que estos tipos de enlaces se destruyen al realizar hidrólisis, se deberían realizar más pruebas para confirmarlo.

En las familias Cladoniaceae y Umbilicariaceae los sobrenadantes y precipitados de la fracción *neutra* tuvieron una composición parecida a los de la fracción *gradiente* aunque en esta última se encuentren por lo general más tipos de residuos o quizá otros componentes no polisacáridicos que compliquen la interpretación de los resultados. Los sobrenadantes y precipitados también tuvieron en común que en el primero se detectó mayor proporción de residuos de Gal f -(1 \rightarrow y $\rightarrow 2$)-Man p -(1 \rightarrow mientras que en el precipitado eran más abundantes los residuos de $\rightarrow 6$)-Man p -(1 \rightarrow . En el caso de las dos especies de *Umbilicaria* se consiguió un pequeño precipitado que no se pudo obtener con

licor de Fehling. En las especies de *Cladonia* estudiadas, el sobrenadante (SP) representó la fracción minoritaria mientras que en la familia Umbilicariaceae se observó que tenía un porcentaje similar al del precipitado e incluso, en las especies del género *Umbilicaria*, constituía una fracción mayoritaria. Por todo esto, se eligieron las fracciones *neutras* de estas dos familias para analizar, en mayor profundidad su estructura.

Familia Parmeliaceae: *P. glauca* y *P. furfuracea*.

La estructura básica del polisacárido de estas dos especies corresponde a la del galactomanano aislado en la fracción de *P. glauca* F1Sg(1) PP. Ésta se describe en la Figura 46.

En ella se aprecia una estructura, $\rightarrow 1) \alpha\text{-Manp}-(6 \rightarrow$, bisustituida en O-2 y O-4 por galactopiranosas α y β que ha sido descrita por Teixeira *et al.* 1995 como característica de un grupo de especies correspondientes a la familia Parmeliaceae. Hasta el momento no ha sido aislada en otros hongos no liquenizados.

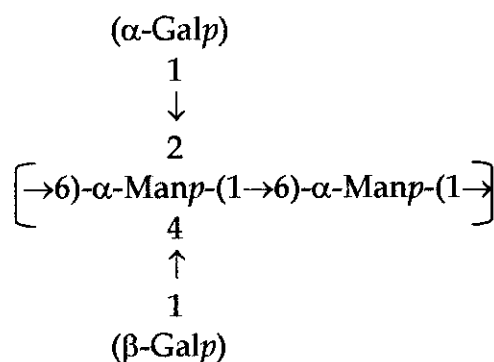


Figura 46. Estructura básica propuesta para los galactomananos de *P. glauca* y *P. furfuracea*.

Este galactomanano difiere de otros descritos en especies de esta familia precisamente en su simplicidad, ya que en otras ocasiones presentan además otros residuos terminales de galactopiranosas (Miceno *et al.*, 1990).

La estructura del polisacárido aislado en el primer pico del gradiente de *P. glauca* Figura 46, resultó más compleja en el segundo y tercer pico al irse

adicionando a la cadena principal de α -manosa-(1 \rightarrow 6), cadenas laterales con residuos de glucosa-(1 \rightarrow 3) y ácido glucurónico-(1 \rightarrow 3) que podrían estar conectados a la cadena principal por O-2. Al reducir el polisacárido, los análisis de metilación pusieron de manifiesto estos tipos de enlace y una buena proporción de residuos terminales/puntos de ramificación. Al no detectarse glucosa o glucurónico terminal podría inferirse que, si el polisacárido está bien metilado, la galactopiranososa seguiría siendo el residuo terminal de estas cadenas laterales probablemente cortas (Tabla 6).

Los polisacáridos aislados de *P. furfuracea* mostraron un espectro más complicado con otras señales diferentes, aunque conservando la estructura característica de la Figura 46. Los análisis de metilación mostraron la existencia de al menos dos grupos de polisacáridos. En el primer grupo, los polisacáridos precipitados que eluían en el 1^{er} y 2^o pico del gradiente, contendrían cadenas laterales de glucosa-(1 \rightarrow 3), ác. glucurónico-(1 \rightarrow 3) y algunas de ác. glucurónico-(1 \rightarrow 2). Como se puede apreciar por los análisis de MALDI-TOF (Figura 14), realizados con estos polisacáridos después de someterlos a acetólisis, la longitud de las cadenas laterales conteniendo grupos ácido era muy variable y, por el momento no se ha podido aislar o determinar una estructura repetitiva o característica del mismo. Al ser cadenas más largas y en mayor proporción que en *P. glauca*, cuando el polisacárido se redujo y se logró una metilación mejor, el porcentaje de residuos terminales subió (Tabla 7). Estos polisacáridos son semejantes a los aislados minoritariamente en la fracción A2S PC cuya elución en columna de exclusión molecular mostró por análisis de ¹H-RMN, una composición heterogénea, debido a las cadenas laterales citadas. El segundo grupo lo constituyó el o los polisacáridos que eluían en el tercer pico del gradiente y que son mayoritarios en esta fracción F1S. Se diferenciaron por tener menor porcentaje de ác. glucurónico unido en (1 \rightarrow 3) y presentar galactofuranosa unida en (1 \rightarrow 5) en su composición.

Teixeira *et al.* en 1994 aislaron dos tipos de glucogalactomananos de *Evernia prunastri* con una estructura básica similar a la descrita en la Figura 46, que se

diferenciaban principalmente por su contenido en grupos ácidos. El primer tipo, tenía un mayor Pm y precipitaba con Cetavlon a pH 7,0. Presentaba más ác. glucurónico que el segundo y éste provenía de cadenas de $\rightarrow 3)-\alpha\text{-Glc}pA-(1\rightarrow 6 \alpha\text{-Glc}pA-(1\rightarrow 3)-\text{Glc}p-$. En el segundo tipo de polisacárido, que precipitaba a pH 8,5, describen otra estructura original de la especie *Evernia prunastri*, $\alpha\text{-Gal}p-(1\rightarrow 2)-\text{Glc}p-$, que se encontraba de forma más abundante que en el primer polisacárido. En los polisacáridos aislados mediante nuestro protocolo parece que también hemos separado parcialmente, quizá por diferencias en Pm, dos tipos de polisacáridos con distinta proporción de ácido y hemos encontrado en común el residuo $\rightarrow 3)-\alpha\text{-Glc}pA-(1\rightarrow$. Sin embargo, se han detectado otras estructuras, lo que pone de manifiesto que estos polisacáridos, dentro de la heterogeneidad observada, contienen elementos para diferenciar grupos de especies relacionadas.

Sin duda se hace necesario un mayor estudio de éstos para constatar el grado de purificación al que se ha llegado.

Familia Umbilicariaceae: *L. pustulata*, *L. hispanica*, *U. polyphylla* y *U. crustulosa*.

En esta familia son escasos los ejemplos de galactomananos estudiados por otros autores. Además, los protocolos empleados en la purificación de los éstos son diversos, con lo que se hace difícil establecer comparaciones. En nuestro caso, parece que el protocolo empleado purificó al menos dos tipos de galactomananos cuyas diferencias generales ya han sido discutidas y como hemos expuesto, el estudio de la estructura se centrará en las fracciones *neutras*. En la fracción F1S_n SP la abundancia de galactofuranosa hizo necesario realizar una hidrólisis parcial que liberara estos residuos de la cadena central o *core* para estudiar la estructura. Éstas se representan en la Figuras 47 y 48.

crustaceum. Por acetolisis y análisis de MALDI-TOF se pudo comprobar en *L. pustulata* la gran variabilidad en longitud de todas cadenas laterales. Esta técnica nos sirvió de ayuda y fue complementaria a los análisis de ^1H -RMN, para conocer la longitud y proporción de estas cadenas laterales.

La metilación y la hidrólisis del polisacárido **F1Sn** SP puede no ser total (como se desprende de la mala relación terminales/puntos de ramificación del polisacárido entero), por lo que se requieren más análisis para determinar la estructura completa. De todas formas se puede apreciar que las cadenas de galactofuranosa laterales o de galactofuranosa terminal unidas a este esqueleto por varios puntos dan una gran la variabilidad específica (ver Tablas 16 y 17).

Respecto al polisacárido de la fracción **F1Sn** PP, se ha podido esquematizar parte de la estructura. Ésta se representa en la Figura 49.

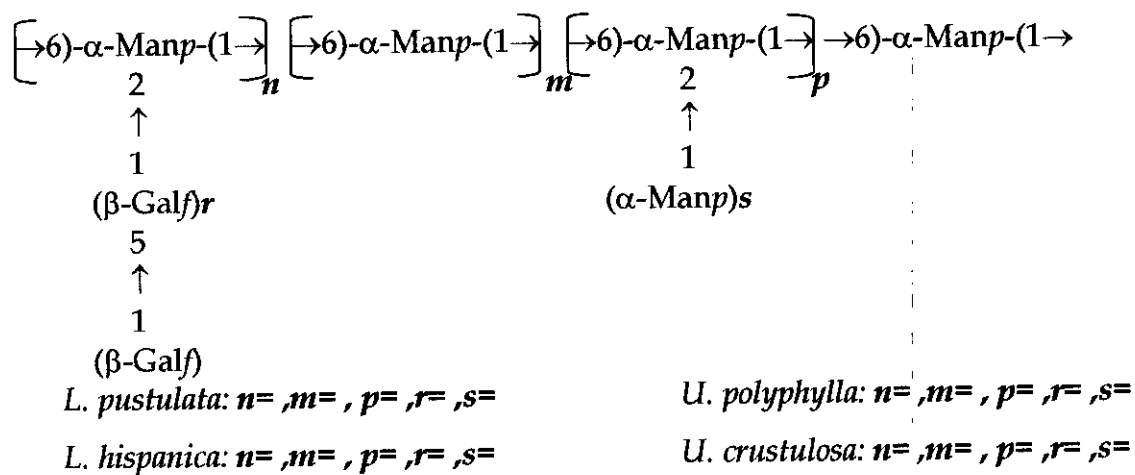


Figura 49. Estructura idealizada propuesta para el polisacárido de la fracción **F1Sn** PP de las cuatro especies estudiadas.

Los espectros de ^1H -RMN fueron similares en los cuatro casos, permitiendo constatar la presencia de cadenas de galactofuranosa con uniones (1→5) y probablemente (1→6), sobre todo en los polisacáridos de *Lasallia*, que debido a la hidrólisis empleada en la metilación, se destruían y no eran detectados en los análisis. Pero además de estas cadenas, el polisacárido contiene otros tipos de enlace que no se representan en la Figura NM y han sido detectados por metilación. Los tipos de residuos en las dos *Lasallias* parecen similares y son más numerosos que en las *Umbilicarias*. Además hay que tener en cuenta las

diferentes proporciones de las fracciones, y en *Umbilicaria* F1Sn PP es un porcentaje más pequeño que en *Lasallia* (Tabla 15).

En los trabajos realizados por Kjølborg y Kvernheim (1989) en dos especies *L. pustulata* y *U. spodochoa*, aíslan de manera similar a la empleada en este estudio, galactomananos con tipos de residuos determinados por metilación similares a los obtenidos en la fracción F1Sn PP. También constatan variabilidad de los residuos de las cadenas laterales entre las dos especies.

Parece difícil comprender por qué presentan estos polisacáridos tan relacionados una gran variabilidad en las cadenas laterales pero posiblemente podrían representar un marcador taxonómico, quizá a nivel de especie, aunque un estudio más profundo de las estructuras halladas y con mayor n° de especies sería necesario.

Familia Cladoniaceae: *C. rangiformis*, *C. foliacea* y *C. iberica*

El material aislado en la fracción F1Sn PP parecía estar compuesto, según los análisis de ^1H -RMN por un glucogalactomanano mayoritario cuya estructura se esquematiza en la Figura 50.

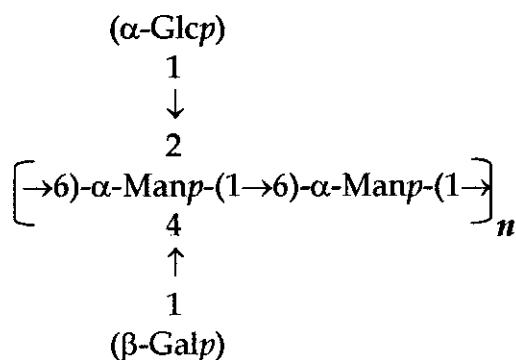


Figura 50. Estructura básica propuesta para los glucogalactomananos de las tres especies de *Cladonia*

La presencia de glucopiranososa terminal se confirmó por el método de Gray (1978) Otros tipos de enlaces minoritarios como $\beta\text{-Gal}_f\text{-(1}\rightarrow$ y $\alpha\text{-Man}_p\text{-(1}\rightarrow 2)$ se detectaron pero probablemente provinieran de otro polisacárido cuya cadena central también sea de manosa en (1 \rightarrow 6). Esto se puede deducir si comparamos

los resultados del análisis de metilación de los precipitados y sobrenadantes. Tampoco se puede descartar la presencia de un tercer tipo o variedad de polisacárido en el que la glucopiranososa terminal de la estructura de la Figura 50 tenga configuración β . A pesar de todo esto, algunas conclusiones generales se pueden apuntar.

Como en los casos de las familias anteriores, los análisis de metilación nos indicaron que los polisacáridos eran parecidos pero poseían diferencias en la proporción de sus cadenas laterales. Por $^1\text{H-RMN}$ el polisacárido más complejo pareció ser el de *C. foliacea* y los polisacáridos más parecidos y algo más simples fueron los de *C. iberica* y *C. rangiforis*.

En los trabajos de Iacomini *et al.*, (1985) y Woranovicz *et al.*, (1997) con especies del género *Cladonia* se determinaron fragmentos de estructuras de estos polisacáridos (ver Introducción) pero en ningún caso los fragmentos propuestos coinciden con el descrito en la Figura 50. Dicho fragmento de estructura difiere en el monosacárido de glucosa, que ellos determinan como manosa. En el protocolo seguido para el aislamiento de los polisacáridos Iacomini *et al.* y Woranovicz *et al.* emplearon la precipitación con solución de Fehling y una posterior con Cetavlon en la que separan los polisacáridos neutros que utilizaron para el análisis. Probablemente estas dos purificaciones no sean suficientes para aislar un solo tipo de polisacárido y por ello, como en nuestro caso, no se pueda proponer una estructura entera del mismo. Del mismo modo, se han podido aislar mayoritariamente dos polisacáridos diferentes y por ello no coinciden sus estructuras, por lo que estudios más completos son necesarios.

3. ESTACIONALIDAD EN LAS FRACCIONES DE *P. FURFURACEA* Y *L. PUSTULATA*

Como premisas se considera que, por una parte, cada fracción se ha purificado de manera que posee un tipo determinado de polisacárido y, por otra, que con el protocolo de fraccionamiento empleado los polisacáridos han sido extraídos de forma sucesiva, según su disposición o accesibilidad en el talo.

Dado que cada polisacárido presenta unas propiedades químicas y tiene una función en el talo, un cambio porcentual de estas fracciones podría estar influyendo, por ejemplo, en la capacidad de retener agua, en la relación alga-hongo o en el crecimiento de éste. Por todo ello, la discusión de los resultados obtenidos debe representar una interpretación de los cambios observados, considerando que no puede excluirse la posibilidad de que éstos podrían ser modificados (o corroborados) al realizar análisis de composición completos o al incrementar el número de especies y observaciones.

En este trabajo se han comparado dos tipos de talos diferentes para intentar verificar la existencia de un patrón general de variación estacional, dado que cambios más específicos requerirían análisis más exhaustivos. Se eligió, por un lado, la especie *P. furfuracea*, por presentar gran plasticidad fenotípica y su variabilidad estructural entre poblaciones ha sido constatada y está directamente relacionada con cambios ambientales (Rikkinen, 1977). Por otro, la especie *L. pustulata*, que también presenta cierta variabilidad estructural, así como notables diferencias en cuanto a su patrón de selección de hábitat respecto a *P. furfuracea*. La comparación entre especies de diferentes hábitats (perennifolio de *Pseudevernia* vs. marcescente de *Lasallia*) permite además realizar inferencias acerca del papel de la radiación lumínica (cuya variabilidad es mayor antónimos al hábitat de *Lasallia*) en la producción polisacáridica.

3.1. Relaciones entre las distintas fracciones y las variables ambientales

Comparando los resultados obtenidos al realizar las correlaciones simples y el PCA con las fracciones para las dos especies (*P. furfuracea* y *L. pustulata*), se pueden apreciar que éstos son semejantes. Mediante el PCA, no obstante, se pudieron observar algunas relaciones no detectadas mediante correlaciones simples. Por ello, éste segundo método multivariante ofreció mayor información acerca de la covariación de los pesos de estas fracciones a lo largo de los dos años de estudio.

Los resultados de los PCAs realizados con las fracciones extraídas de *L. pustulata* y *P. furfuracea*, respectivamente, fueron bastante similares. En los dos

casos se obtuvo un primer factor que agrupó, principalmente, las fracciones A1 y F0, ambos sobrenadantes, con una composición bastante diferente del resto de las fracciones. Esta es la razón más probable que explicaría esta covariación temporal entre las dos fracciones. El segundo factor estableció un gradiente entre la fracción F1S y dos fracciones más internas, diferentes en cada especie (F1I en *Pseudevernia* y F2 en *Lasallia*). El tercer factor agrupó, en los dos casos, las fracciones extraídas con agua caliente (A2 para *Lasallia* y A2S, A2I en *Pseudevernia*), de nuevo con fracciones internas pero, al contrario que en el Factor 2, estas fueron el residuo F2, en *P. furfuracea* y F1I en *L. pustulata*. Estas correlaciones podrían estar indicando que las variaciones en el peso de las fracciones son, por una parte, debidas a diferencias en su composición y por otra, que a pesar de que las fracciones presentan porcentajes de peso respecto al talo diferentes (véase Figuras 9 y 21), sus funciones en el talo podrían ser similares. A pesar de que este patrón de cambio también podría ser debido a errores en la extracción, ello no parece probable debido a que, en tal caso, tendrían que ocurrir de forma similar en los dos años.

Parece mucho más probable que la variabilidad observada responda a diferencias en las condiciones ambientales. Para verificar ésto, dos importantes variables ambientales se correlacionaron, por un lado con las fracciones (Tablas 25 y 33) y, por otro, con los valores de los Factores obtenidos en el PCA (Tablas 27 y 35). Los resultados obtenidos nos proporcionaron información diferente, aunque no contradictoria. En un caso, el gradiente de variación obtenido en el PCA no estuvo correlacionado con ninguna de las variables ambientales. Esto se observó en caso del Factor 2 de *L. pustulata* (en el que se relaciona las fracciones F1S y F2). Más adelante se incidirá de nuevo en este resultado. El caso de la correlación del Factor 1 del PCA realizado para *Pseudevernia*, (que agrupó por un lado, las fracciones A2S, A2I frente a las fracciones A1 y F0) con las variables ambientales resultó más difícil de interpretar, ya que se observó una débil correlación con la precipitación. En estos dos casos, la variación observada y las relaciones entre fracciones, podrían ser causadas por otros factores como el

lumínico, y esto tendría que tenerse en cuenta la interpretación de los resultados así como en posteriores experimentos.

Los resultados que correlacionaron de forma significativa los pesos de las fracciones y una variable ambiental se esquematizan en las siguientes figuras, Figura 51 para *Pseudevernia* y Figura 52 para *Lasallia*.

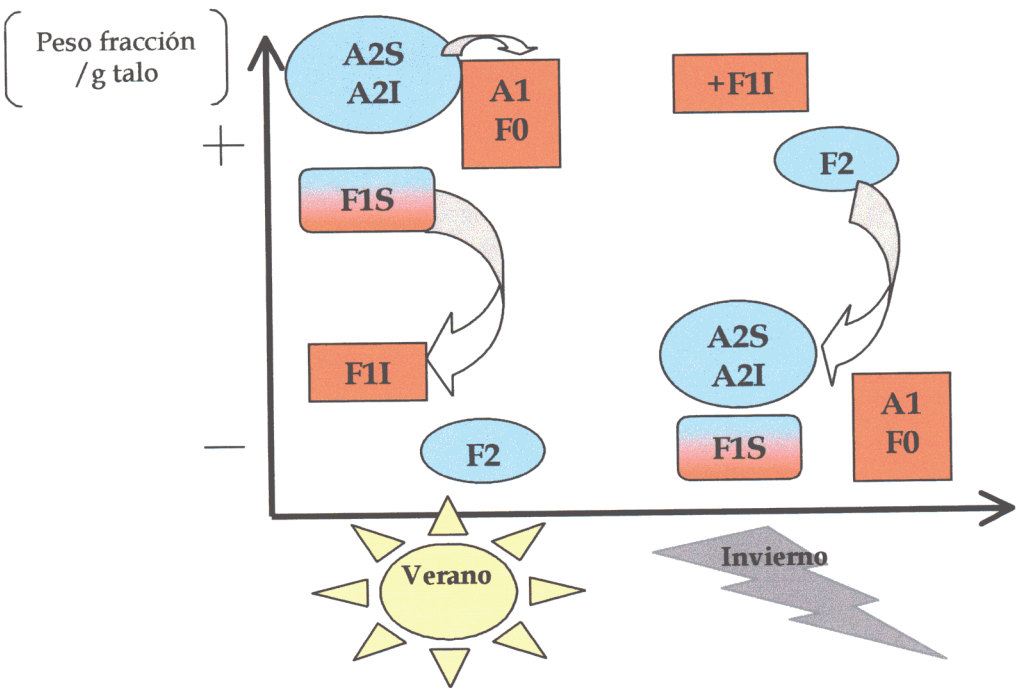


Figura 51. Esquema de las variaciones (indicadas de forma orientativa) en los pesos de las fracciones A1, A2S, A2I, F0,F1S, F1I y F2 de *P. furfuracea* (de las dos poblaciones) agrupadas en dos estaciones extremas: Verano (temperaturas altas y baja precipitación) e Invierno (temperaturas bajas y alta precipitación). Las elipses azules indican correlación con la precipitación y los rectángulos naranjas con la temperatura. Las flechas indican las correlaciones temporales entre los pesos de las fracciones. El color degradado de azul a naranja indica la existencia de correlación entre una fracción y dos variables ambientales.

En esta Figura se puede apreciar que la proporción de las fracciones de naturaleza soluble (A1, A2S, F0 y F1S) es mayor en Verano que en Invierno. La fracción A2I, aunque insoluble, también se incluyó en este grupo de fracciones, lo que nos podría estar indicando que posee un papel de reserva o está implicado en algún tipo de actividad. Las fracciones F1I y F2, siendo más internas, son más abundantes en Invierno que en Verano y podrían representar un incremento en biomasa. La relación de A1 y F0 probablemente sea debida a

su contenido en glicoproteínas y lípidos y, como ocurre en *Lasallia* su interpretación queda fuera del objeto de estudio de esta Tesis.

En el caso de la correlación inversa **F1S** y **F1I**, puede ser lógica si calculamos que de un solo pool de hexosas deben derivar GDP-glucosa, GDP-manosa y GDP-galactosa para dar los correspondientes polímeros. En la relación que tienen con las variables ambientales estudiadas también podemos considerar que las isomerasas para galactosa y manosa requieren un gran aporte de energía de activación, por lo cual un aporte exógeno de calor en los meses de verano favorecería la síntesis de estos polímeros.

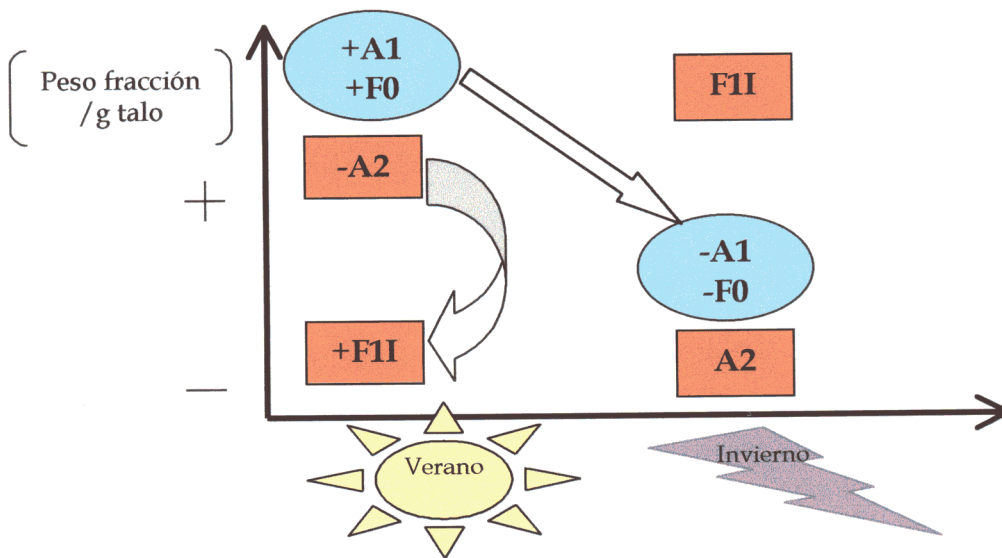


Figura 52. Esquema de las variaciones (indicadas de forma orientativa) en los pesos de las fracciones **A1**, **A2**, **F0**, **F1S** y **F1I** de *Lasallia* agrupadas en dos estaciones extremas: Verano (temperaturas altas y baja precipitación) e Invierno (temperaturas bajas y alta precipitación). Las elipses azules indican correlación con la precipitación y los rectángulos naranjas con la temperatura. Las flechas indican las correlaciones temporales entre los pesos de las fracciones.

En cuanto a *Lasallia* se observa un menor número de correlaciones significativas entre fracciones y variables ambientales. Es probable que el clima de su localidad, al ser menos extremo pueda contribuir a explicar este resultado. La proporción de las fracciones extraídas con agua (**A2** y **A1**), como en el caso anterior (**A2S**, **A2I**, **F0** y **A1** en *P. furfuracea*) es mayor en los meses de Verano que en los de Invierno. Sin embargo, mientras que la fracción **A2** en *L. pustulata* parece estar más relacionada con la temperatura (factor más variable

en esta localidad), los glucanos A2S, A2I en *P. furfuracea* se relacionan directamente con la precipitación. Del mismo modo que en el caso anterior, la fracción más interna, F1I fue menos abundante en los meses con temperaturas elevadas y más producida en el talo en los meses más fríos. El peso de los sobrenadantes (A1 y F0) se relacionó positivamente con la precipitación. Esto muestra una variación estacional de los pesos de estas fracciones (cuyos componentes mayoritarios son glicoproteínas y lípidos), que ha sido estudiada por otros autores (Hagemant y Fahselt, 1986; Dembitsky *et al.* 1993).

3.2. Análisis de la variación estacional mediante análisis de la varianza

El porcentaje de correlación de una fracción o Factor de un PCA con una variable ambiental no fue muy elevado. Por tanto se podrían aducir otras interpretaciones que explicaran (también parcialmente) los resultados obtenidos. Por ello, fue preciso un análisis detallado de la variación estacional de los pesos de las fracciones.

3.2.1. Variaciones estacionales y poblacionales de *P. furfuracea*

En este caso se estudiaron dos localidades, y al comparar las proporciones de las fracciones respecto a este factor poblacional, se observó que, en la mayoría de los casos, existían diferencias significativas que ocurrían de forma constante a lo largo de las 8 estaciones de los dos años estudiados. Respecto a las fracciones A2I, F1S y F2, su peso seco resultó mayor en la población de la Presa del Pradillo que en Valsaín. En el caso de la fracción F1I se observó mayor proporción en Valsaín que en la otra localidad, y para la fracción A2S las proporciones fueron similares. Estos resultados podrían estar relacionados con un cambio estructural del talo, adaptado a las diferentes condiciones microclimáticas de cada localidad, y nos daría una idea de la consistencia de la variación estacional observada.

Fracciones extraídas con agua

Aunque la fracción A2S y la precipitación estén correlacionadas, las proporciones de la fracción A2S sólo se ven modificadas si existe gran variación

en las condiciones ambientales. Es muy probable condiciones menos extremas no llevaran consigo un cambio en la producción de esta fracción. Esto se desprende del análisis de las variaciones estacionales de esta fracción. Únicamente se observaron diferencias estacionales en el primer año en la localidad de Valsaín. Ello podría explicarse atendiendo a que la precipitación fue más abundante en el primer año sobre todo en esta localidad y no en la otra (Presa del Predillo). De todas formas, como la composición de esta fracción es algo heterogénea, (aunque esté compuesta principalmente isoliquenano), con los datos de que se dispone no es posible confirmar si el incremento en los meses de Primavera es debido al aumento en la producción de este glucano o al de otros componentes. Por otra parte, A2S fue la única fracción para la que no se observaron diferencias poblacionales al analizar los dos años conjuntamente. No obstante, esto también se justificaría en base a que su proporción en el talo es pequeña y, por tanto, sólo cambiaría cuando las condiciones ambientales fueran extremas.

Las variaciones estacionales y poblacionales observadas en el caso de la fracción A2I fueron más constantes y, además, representaron una proporción mayor en el talo que la fracción A2S. Pero la interpretación de los resultados obtenidos para esta fracción debe tener en cuenta la relación existente entre esta fracción y el residuo F2, ya que las variaciones de las fracciones, además de depender de las condiciones atmosféricas, dependen del nuevo incremento en biomasa del talo. Sin embargo, dado que no se poseen datos de la composición exacta de cada fracción en los distintos meses de estudio, las explicaciones más plausibles pueden ser dos.

Primero, considerando que la composición de la fracción A2I sería más homogénea que la de A2S, su variación sí podría ser atribuida a un cambio en la producción de glucano por parte del hongo, promovido, al menos en parte, por la variación en la precipitación. Estimando que A2I puede ser material en parte extracelular (al ser un glucano extraído con agua caliente) y F2 una medida del incremento de la biomasa (al contener el complejo glucano-quitina), las variaciones observadas podrían explicarse en base a un cambio lento, en el

que la baja precipitación en Verano provocaría el comienzo de la movilización de estos glucanos, que llegarían a un mínimo en Otoño. En esta estación las condiciones ambientales son favorables (precipitación y temperatura moderadas), para que exista crecimiento. De este modo, observamos cómo se alcanza un máximo en la proporción de F2 en este momento. En Primavera, donde las condiciones son también favorables, y teniendo en cuenta el nuevo incremento en biomasa, se acumularían precursores suficientes para aumentar la cantidad de este material (A2I).

La segunda explicación sería que la disposición de los materiales varíe a lo largo de las estaciones. En Otoño tanto A2S como A2I serían más difícilmente extraídos con agua caliente y su proporción sería menor que en las otras estaciones. Al quedarse retenidos estos polisacáridos en el talo incrementarían la proporción de F2. También parecería lógico que estuviera relacionado de alguna manera con F1I, al ser una fracción polisacáridica de composición similar y que se extrae a continuación en el protocolo, pero esto no se ha observado y, por ello, la explicación de la disposición diferencial de los materiales se debe considerar, a priori, menos probable.

La fracción sobrenadante, A1, podía contener gran cantidad de glicoproteínas con una alta proporción de parte glucídica ya que se presentó en el talo en gran proporción y, por ello, se estudió su variación estacional. Los análisis pusieron de manifiesto que, aunque existía correlación inversa con A2S y A2I, el patrón de variación estacional no fue exactamente el contrario al de estas fracciones. Ello sugiere que cada fracción se comportaría de forma independiente, siempre condicionados, en parte, por las variaciones climáticas.

Fracciones extraídas con álcali

El conjunto de fracciones F1S y F1I parece tener una variación particular muy relacionada con los cambios ambientales en precipitación y temperatura. La composición (galactomananos y β -(1→3) (1→4) glucano, respectivamente) y disposición más interna de las mismas nos indica que, probablemente, sean los constituyentes estructurales de la pared del hongo y, por ello, cambios en sus proporciones estarían ligados a crecimiento celular.

La fracción F1S presentó una disminución en peso en Invierno respecto a otras estaciones en relación con un aumento de la precipitación y un descenso en las temperaturas. Las variaciones estacionales sólo mostraron la existencia de diferencias significativas el primer año, y la precipitación en éste fue más abundante que en el segundo. Estas variaciones no se vieron anuladas por las de otras fracciones extraídas con álcali, por lo que parecen tener consistencia, aunque siempre teniendo en cuenta el estado del talo. Al no conocer exactamente la composición de esta fracción, no tiene sentido especular sobre cual de sus componente es el responsable de las variaciones observadas, aunque se ha demostrado que hongos que contienen más de un tipo de mananos, como es el caso, la proporción de éstos puede variar según el medio de cultivo (Gorin *et al.* 1969). Análisis preliminares de la composición en polisacáridos en Verano de esta fracción han mostrado que la complejidad del galactomanano que la constituye es mayor en la población de Valsáin que en la de Presa del Pradillo. El componente ácido de esta fracción, por el contrario, es mayor en Presa del Pradillo que en la fracción aislada de la población de Valsáin. Estos resultados nos indican que la heterogeneidad de la fracción podría ser determinada por la variación de las condiciones ambientales, pero sin duda es necesario un estudio más completo.

La variación estacional del peso de la fracción F1I está directamente relacionado con la variación de la fracción F1S. No obstante, no se ven anulados por ella (al realizar un ANCOVA de F1I con F1S como covariante las variaciones son significativas) y tienen base en las variaciones ambientales (Tabla 31). Por su composición heterogénea en galactomananos y glucanos, el cambio en su proporción es difícilmente justificable si no conocemos que polisacárido/s varía/n.

A la vista de la estrecha relación entre F1S y F1I, también se puede argumentar que a lo largo de los meses se haya producido una diferente solubilidad en agua de los compuestos extraídos con álcali y que ésta ha coincidido con los cambios climáticos. Ésto se podría justificar si a lo largo de las estaciones existiera una producción de galactomananos con diferente

solubilidad o si éstos se dispusieran de forma diferente en la pared de modo que unas veces son más accesibles que otros y se extraen mejor.

Fracción residual F2

Las diferencias significativas observadas en las variaciones estudiadas de esta fracción nos indican la existencia de un incremento en hongo y alga en Otoño (lo que puede venir corroborado por el ligero incremento paralelo de F1I como componente de la pared fúngica con F2). A ello le sigue un incremento de las fracciones ricas en glucano (A2S, A2I), como se comprueba con las relaciones establecidas en el factor 3 del PCA.

3.2.2. Variaciones estacionales de *L. pustulata*

Con los análisis de correlaciones simple y múltiple se constató la existencia de escasas relaciones entre fracciones (Figura 52), e incluso la relación entre F1S y A2 no estaba a su vez correlacionada con la temperatura o precipitación. Mediante los distintos modelos empleados para el análisis de la varianza se intentó constatar cómo era la variación de los pesos de las fracciones que se relacionaban con las variables ambientales citadas y, en los casos restantes, si existían cambios constantes en las proporciones en los dos años de estudio o si, por el contrario, esta variación era al azar.

Fracción extraída con agua

El patrón general de variación observado para esta fracción (A2) está muy relacionado con la temperatura. Al no estar correlacionado directamente con la fracción F1I, se confirma la importancia de dicho factor como posible promotor de procesos de cambio (véase el factor 3 del PCA, Tabla 35) que en último término vendrían dados por el crecimiento. Lamentablemente no conocemos las proporciones de glucanos β -(1→3) y β -(1→6) de las fracciones aquí relacionadas y las interpretaciones de los resultados pueden ser varias.

Comparando este patrón con el descrito para *Pseudevernia*, las similitudes son claras y la diferencia estriba en la estación con menor proporción de glucanos extracelulares (Otoño en *Pseudevernia* e Invierno en *Lasallia*). Por ello, una explicación posible sería al considerar las fracciones A2 y F1I (de la misma

forma que en el caso de *P. furfuracea*) como material de reserva y constituyente de la pared fúngica, respectivamente. Los glucanos de reserva o material capaz de retener agua serían sintetizados en las condiciones más favorables de Primavera (se observa un máximo en la proporción de A2 y por tanto, una disminución relativa de F1I). En las condiciones desfavorables de Invierno, A2 se metabolizaría, aumentando de este modo la proporción relativa de F1I. Otoño se podría considerar como la estación en la que se produciría un incremento en peso de las fracciones de disposición más interna, F2 y F1I, lo que puede indicar un incremento en biomasa (tanto para *Lasallia* como *Pseudevernia*) y por ello no es sorprendente un incremento también de el peso de A2. En Verano la cantidad relativa de A2 en el talo fue muy variable. Según la Figura 37, el primer año dicha proporción fue escasa, mientras que en el segundo fue bastante mayor. Esto también nos indicaría una tendencia, semejante a la de la fracción A2 de *Pseudevernia*, a mantener o ir disminuyendo su proporción en función de las condiciones ambientales.

Por otra parte, otra explicación que justificaría este cambio es que al ser dos fracciones que han sido extraídas de forma consecutiva por el protocolo, el cambio puede deberse a una disposición diferencial a lo largo de las estaciones del β -(1 \rightarrow 6) glucano (pustulano). Así, en Otoño, el material sintetizado sería más fácilmente accesible, incrementando su proporción en la fracción extraída con agua, disminuyendo en la fracción más interna (F1I) (aunque no totalmente, ya que como hemos visto antes, también se observa un incremento de esta fracción). En Invierno, este comportamiento sería el contrario encontrándose mayor proporción en la fracción A2 que en F1I. En la Primavera, debido una nueva disposición de material, (similar a la situación observada en Verano) se produciría un incremento de la fracción A2.

Fracción extraída con álcali y residuo final

Las fracciones F1S y F2 están relacionadas inversamente, pero no ha sido observado que dicho cambio esté fundamentado en la variación de temperatura o precipitación. El análisis de la varianza mostró que únicamente la fracción F2 presentaba variación estacional consistente durante los dos años estudiados, y

que esta variación no era anulada al incluir covariantes en los modelos empleados. La fracción F1S, por su parte, no presentó diferencias significativas entre estaciones y la variación no fue constante durante los dos años. No obstante, para a una interpretación correcta del significado de la variación de F2, incluyendo su relación con F1S, de nuevo se plantea el problema de no conocer la composición exacta de cada una de las fracciones. Sin embargo es posible plantear como explicación que al ser dos fracciones (F1S y F2) de composición y proporción en el talo diferente, también pueden influir en su variación estacional diversos factores ambientales, como la temperatura o la precipitación o como la radiación lumínica.

Todo ello plantea que esta línea de investigación puede dar nuevos, interesantes y esclarecedores resultados en el futuro que nos ayuden a comprender mejor las relaciones entre estos organismos y su medio a nivel fisiológico.

3.3. Variación cualitativa de la fracción F1S de *L. pustulata*

Mediante la filtración en gel de intercambio iónico se observó que los polisacáridos de esta fracción tenían el mismo comportamiento al eluir en columna. La composición en monómeros neutros de estas fracciones realmente no sufrió una variación considerable en los dos años de estudio y para finalizar, los espectros de ^1H -RMN de las fracciones precipitadas (F1Sn PP y F1Sg PP) con propanol (Figura 44) mostraron los mismos picos característicos, descritos en el apartado 2.9 de Resultados. Aunque los espectros de ^1H -RMN de las fracciones sobrenadantes (F1Sn SP y F1Sg SP) no se recogieron, con estos resultados se prueba en esta especie que, por un lado, el galactomanano aislado tiene una estructura constante en el tiempo y por otra, que el método de aislamiento empleado es repetitivo y fiable.

CONCLUSIONES

1. Se purificaron y caracterizaron diversos tipos de glucanos en todas las especies estudiadas.

- a) En la familia Parmeliaceae se aislaron tres tipos: un glucano lineal soluble α -(1→3)-(1→4) con proporciones de los enlaces 2:1 (tipo isoliquenano), en *P. furfuracea* y *P. glauca*. Un glucano lineal insoluble α -(1→3)-(1→4) con proporciones de los enlaces 1:2, en *P. glauca*. Y por último, un glucano lineal insoluble (tipo liquenano), β -(1→3)-(1→4) con proporciones de los enlaces 2:1 en *P. furfuracea*.
- b) En la familia Umbilicariaceae, se aisló de todas las especies un β -(1→6) glucano lineal parcialmente acetilado (pustulano).
- c) En la familia Cladoniaceae se aisló un α -(1→3)-(1→4) glucano ramificado insoluble (tipo nigerano).

2. Se purificaron galactomananos aislados de la pared celular del micobionte, comprobándose que en todos los casos existía más de un polisacárido de este tipo en cada especie.

- a) En la familia Parmeliaceae se purificó un polisacárido de *P. glauca*, con la estructura descrita en la Figura 46. En otros polisacáridos aislados de las dos especies (*P. glauca* y *P. furfuracea*) dicha estructura se hace más compleja, mostrando otras cadenas de galactofuranosa, α -(1→3)-glucosa y ácido glucurónico.
- b) En la familia Umbilicariaceae se purificaron al menos dos tipos de galactomananos para cada especie estudiada. La estructura del *core*, detallada en las Figuras 47 y 48, mostró similitudes entre los géneros. La estructura del polisacárido F1Sn PP se muestra en la Figura 49. De los análisis se desprende la variedad en las cadenas laterales de estos polisacáridos que complican la interpretación de los resultados, pero que a su vez muestran la posibilidad de emplearlos como marcadores taxonómicos.

c) En la familia Cladoniaceae se caracterizó parcialmente una estructura reseñada en Figura 50, no descrita previamente en otras especies de la familia.

3. Los polisacáridos del talo, aislados y caracterizados en este trabajo, muestran diferencias en composición y estructuras entre sí y con los polisacáridos descritos en otros grupos. Dentro de su diversidad presentan características comunes que demuestran el parentesco de los géneros estudiados. Son excelentes marcadores que pueden ayudar a la delimitación de grupos taxonómicos y podrían tener valor filogenético.

4. Para investigar si existía variación estacional de los porcentajes que representaban las distintas fracciones extraídas de la pared, se eligieron dos especies, *L.pustulata* y *P. furfuracea*. Se observó que existía dicha variación estacional y que los resultados obtenidos el primer año se repetían en el segundo. Esta tendencia se vio relacionada con las variaciones de temperatura y precipitación, lo que indica que las condiciones ambientales afectan a la producción de polisacáridos.

5. Se encontraron diferencias significativas entre los pesos de las fracciones de *P. furfuracea* de la localidad de Valsaín y los de la Presa del Pradillo. Estas diferencias interpoblacionales fueron constantes a lo largo del año y pueden producirse por diferencias ambientales existentes entre ambas localidades.

6. Los glucanos solubles en agua caliente producidos por las dos especies parecen ser más abundantes en condiciones de alta temperatura y baja precipitación (Verano), proponiéndose un papel de protección o reserva de estos polisacáridos frente al estrés. La fracción residual que contiene el complejo glucano-quitina del micobionte y paredes del fotobionte, incrementa su proporción en la estación favorable (Otoño), lo que indicaría que el crecimiento del talo se produce preferentemente en esta época y podría hacerse utilizando parcialmente los glucanos.

7. El peso de la fracción que contenía polisacáridos del tipo galactomanano varió de forma diferente en las dos especies, probablemente por su distinta proporción en el talo. En *P. furfuracea*, la variación parece muy relacionada con

las condiciones ambientales. En *L. pustulata* la composición y porcentaje de ésta parece bastante estable con el tiempo (Figura 44).

8. En este trabajo se sugiere que la síntesis de algunos polisacáridos está influenciada por las condiciones ambientales y podría considerarse un mecanismo de adaptación al medio.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmadjian, V. (1987). Coevolution in lichens. Endocytobiology III. Reprinted from Vol. 503. Annals of the New York Academy of Sciences: 307-315

Armstrong, R. A. (1974). Growth phases in the life of a lichen thallus. New Phytol., 73: 913-918

Atkinson, A. W., Gunnig, B. E. S. y John, P. C. L. (1972). Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: ultrastructure, chemistry and incorporation of ^{14}C -acetate, studied in synchronous cultures. Planta, 107: 1-32

Bacon, J. S. D., Farmer, V. C., Jones, D., y Taylor, I. F. (1969). The glucan components of the cell wall of baker's yeast (*saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultrastructure. Biochemical Journal, 114: 557-567

Bartnicki-García, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Annual Reviews of Microbiology 22: 87-108

Bartnicki-García, S. y Reyes, F. (1968). Polyuronides in the cell wall of *Mucor rouxii*. Biochim. Biophys. Acta, 170: 54-62

Berbee, M. L. y Taylor, J.W. (1992). Convergent ascospore dispersal among pyrenomicete fungi inferred from 18S ribosomal DNA sequence. Molecular Phylogenetics and Evolution. 1: 274-284

Berzelius, J. J. (1815). Versuche über die Mischung des Isländischen Moores und seine Anwendung als Nahrungsmittel. J. Chim. Phys., 7: 317

Boissière, J-C. (1987). Ultrastructural relationships between the composition and the structure of the cell wall of the mycobiont of two lichens. En J. Cramer (Ed.) Progress and Problems in Lichenology in the Eighties. Bibl. Lichenol., 25: 117-132. Berlin-Stuttgart

Bourne, E. J., Megarry, M. L. y Percival, E. (1974). Carbohydrates metabolised by the green seaweed *Urospora penicilliformis*. J. Carbohy. Nucleosid Nucleotid. 1: 235-264

Bubrick, P. (1988) Effects of symbiosis on the photobiont. En M. Galun (Ed.) Handbook of lichenology: 133-144. CRC Press. Boca Raton, Florida

Büdel, B. y Scheidegger, C. (1996). Thallus morphology and anatomy. En T.H. Nash III (Ed.) Lichen Biology: 37-64. Cambridge University Press

Ciucanu, I. y Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. Carbohydrate Research, 131: 209-217

Common, R. S. (1991). The distribution and taxonomic significance of lichean and isolichean in the Parmeliaceae (lichenized Ascomycotina), as determined by iodine reactions. I. Introduction and methods. II. The genus *Alectoria* and associated taxa. Mycotaxon, XLI (1): 67-112

Corsaro, M. M., De Castro, C., Evidente, A., Lanzetta, R., Molinaro, A., Mugnai, L., Parrilli, M. y Surico, G. (1998). Chemical structure of two phytotoxic exopolysaccharides produced by *Phomopsis foeniculi*. Carbohydrate Research, 308 (3-4): 349-57

Cronshae, J., Myers, A. y Preston, R.D. (1958). A chemical and physical investigation of the cells walls of some marine algae. Bioch. Biophy. Acta, 27: 89-103

De los Ríos, A., García-Sancho, L., Valladares, F. y Ascaso, C. (1999). Influencia de la radiación en la anatomía y los pigmentos fotosintéticos de dos

líquenes de montaña mediterránea. Actas del XIII Simposio de Botánica Criptogámica: 128. Madrid

De Priest, P. Examining the phylogeny and evolution of lichen symbionts. Actas del XIII Simposio de Botánica Criptogámica: 12. Madrid

Domenech, J., Prieto, A., Barasoain, I., Gómez-Miranda, B., Bernabé, M. y Leal, A. (1999). Galactomannans from the cell walls of species of *Paecilomyces* sect. *Paecilomyces* and their teleomorphs as immunotaxonomic markers. *Microbiology*, 145: 2789-2796

Dubois, M., Giller, K. A., Rebers, P. A. y Smith, F. A. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356

Farr, D. R., Schuler-Hovanessian, A. y Horisberger, M. (1977). Structure of an α -D-galactosaminoglycan from *Pysarum policephalum* spherule walls. *Carbohydrate Research*, 59: 151-154

Farrar, J. F. (1988) Physiological buffering. En M. Galun (Ed.) *Handbook of lichenology*: 101-105. CRC Press. Boca Raton, Florida

Frey, E. y Preston, R.D. (1968). Non cellulosic structural polysaccharides in algae cell walls III. Mannan in siphonous green algae. *Proceeding of the Royal Society of London Series B*, 169: 127-145

Galun, M., Braun, A., Frensdorff, A. y Galun, E. (1976). Hyphal walls of isolated lichen fungi. *Arch. Microbiol.*, 108: 9-16

Gargas, A., DePriest, P., Gruge, M. y Tehler, A. (1995). Multiple origins of lichen symbiosis in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Nature*, 268: 1492-1495

Gómez-Miranda, B., Rupérez, P. y Leal, J.A. (1981). Changes in chemical composition during germination of *Botrytis cinerea* sclerotia. *Current Microbiology*, 6: 243-246

Gorin, P. A. J. y Iacomini, M. (1984). Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. *Carbohydrate Research*, 128: 119-132

Gorin, P. A. J. y Spencer J. F. T. (1968). Structural chemistry of fungal polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem.*, 23: 367-417

Gorin, P.A.J. y Iacomini, M. (1984). Polysaccharides of the lichen *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. *Carbohydrate Research*. 128: 119

Gorshkova, R. P., Nazarenko, E. L., Zubkov, V. A., Stepanenko, L. S. e Iasakov, V. V. (1997). Structural study of polysaccharides from *Cetraria cucullata* and *Cetraria islandica* lichens. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 23 (2): 122-125

Gray, G. R. (1987). Reductive cleavage of permethylated polysaccharides. *Methods in Enzymology*, 138: 26-38

Hageman, C. y Fahselt, D. (1986). Constancy of enzyme electrofocusing patterns in a stand of the lichen *Umbilicaria mammulata*. *Canadian Journal of Botany*, 64: 1928-1934

Hale, M. E. (1973). Growth. En V. Ahmdjian y M. E. Hale (Eds.) *The Lichens*: 473-492. Academic Press. London

Hestmark, G. (1997). Growth from the centre in an umbilicate lichen. *Lichenologist* 29 (4): 379-383

Honegger, R. y Bartnicki-García, S. (1991). Cell wall structure and composition of cultured mycobionts from the lichens *Cladonia caespiticia*, *C. macrophylla* and *Phycia stellaris* (Lecanorales, Ascomycetes). *Mycol. Res.* 95 (8): 905-914

Honegger, R. y Brunner, U. (1981). Sporopollenin un the cell walls of *Coccomyxa* and *Myrmecia* phycobionts of various lichens: an ultrastructural and chemical investigation. *Can. J. Bot.*, 59: 2713-2733

Honegger, R., Verena, K. y Ruffner, H. P. (1993). Polyol patterns in eleven species of aposymbiotically cultured lichen mycobionts. *Mycol. Res.*, 97 (1): 35-39

Hongger, R., Peter, M. y Scheerrer, S. (1996). Droughth induced structural alterations at the mycobiont-photobiont interface in a range of foliose macrolichens. *Protoplasma*, 190: 221-231

Iacomini, M., Schneider, C. L. y Gorin, P. A. J. (1985). Comparative studies on the polysaccharides of *Cladonia alpestris* (Reindeer Moss), *Cladonia confusa*, and *Cladonia amaurocraea*. *Carbohydrate Research*, 142: 237-251

Iacomini, M., Zanin, S.M.W., Fontana, J.D. y Gorin, P.A.J. (1987). Isolation and characterization of β -D-glucan, heteropolysaccharides and trehalose components of the basidiomycetous lichen *Cora pavonia*. *Carbohydrate Research*. 168: 55-

Kappen, L. (1988). Ecophysiological relationships in different climatic regions. En M. Galun (Ed.) Handbook of Lichenology Vol. 2: 37-99. Boca Raton. CRC Press

Kappen, L., Schroeter, B., Hestmark, G. y Winkler, B. (1996). Winter activity of umbilicarious lichens. Botanica Acta.

Karrer, P. y Joos, B. (1924). Polysaccharide. XXX. Zur Kenntniss des isolichenins. Hoppe-Seyler'sZ. Physiol. Chim. 141: 311

Kershaw, K. A. (1977). Physiological-environmental interactions in lichens. II. The pattern of net photosynthetic acclimation in *Peltigera canina* var. *praetextata* and *P. polydactyla*. New Phytol., 79: 377-390

Kershaw, K. A. (1985). Physiological Ecology of Lichens. Cambridge University Press

Kjølberg, O. y Kvernheim, L. (1989). Studies on the polysaccharides of lichens III. The structure of alkali-soluble polysaccharides in *Umbilicaria pustulata* (L.) Hoffm. Y *Umbilicaria spodochoa* (Ach.) Hoffm. Acta Chemica Scandinavica, 43: 280-285

Laine, R. A., Esselman, W. J. y Sweeley, C. C. (1972). Gas-liquid chromatography of carbohydrates. Methods in Enzymology, 28: 159-167

Larson, W. D. (1983). The pattern of production within individual *Umbilicaria* lichen thalli. New Phytol., 94: 409-419

Latgé, J.-P., Kobayashi, H., Debeaupuis, J. P., Diaquin, M., Sarfati, J., Wieruszeski, J. M., Parra, E., Bouchara, J. P. y Fournet, B. (1994). Chemical and

immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, 62: 5424-5433

Leal, J. A. y Bernabé, M. (1998). Taxonomic applications of polysaccharides. En J. C., Frisvad, P. D. Bridge, y D. K. Arora, (Eds.) *Chemical Fungal Taxonomy, Handbook in Applied Mycology* vol. 6, Marcel Dekker, INC. N. Y./BASE/HONG KONG

Leal, J. A., Gómez-Miranda, B., Bernabé, M., Cano, J. y Guarro, J. (1992). The chemical composition of six species of *Aphanoascus*: The taxonomic significance of the presence of α -(1→2)-(1→6) mannan and α -(1→4) glucan. *Mycological Research*, 96: 363-368

Lechowicz, M. M. (1983). Age dependence of photosynthesis in the caribou lichen *Cladina stellaris*. *Plant Physiology*, 71: 893-895

Lines, C. E. M., Ratcliffe, R. G., Rees, T. A. V. y Southon, T. E. (1989). A C^{13} MNR study of photosynthate transport and metabolism in the lichen *X. calcicola* Oxner. *New Phytologist*, 111: 447-456

López-Franco, R., Bartnicki-García, S. y Backer, C.E. (1994). Pulsed growth of fungal hyphal tips. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 91: 12228-12232

Margulis, L. (1981). *Symbiosis in cell evolution*. W. H. Freeman, San Francisco.

McKie, I. M. y Percival, E. (1961). Polysaccharides from the green seaweed of *Caulerpa* spp. Part III Detailed study of the water-soluble polysaccharide of *C. filiformis*. Comparison with the polysaccharide synthesis by *C. racemosa* and *C. sertularioides*. *J. Chem. Soc.*: 3010-3015

Miyazaki, T. e Irino, T. (1970). Acidic polysaccharides from the cell wall of *Absidia cylindrospora*, *Mucor mucedo* and *Rhizopus nigricans*. Chem. Pharm. Bull., 18: 1930-1931

Money, N. P. (1997). Wishful thinking of turgor revisited: The mechanics of fungal growth. Fungal Genetics and Biology., 21: 173-187

Money, N. P. (1999). On the origin and functions of hyphal walls and turgor pressure. Mycological Research, 103 (10): 1360

Nishikawa, Y., Ohki, K., Takahasi, K., Kurono, G., Fukuoka, F. y Emori, M. (1974). Studies of the water soluble constituents of lichens. II. Antitumor polysaccharides of *Lasallia*, *Usnea*, and *Cladonia* species. Chem. Pharm. Bull., 22 (11): 2692-2702

Nishikawa, Y., Tanaka, M., Shibata, S. y Fukuoka, F. (1970). Polysaccharides of Lichens and Fungi. IV. Antitumor active O-Acetylated pustulan-type glucans from the lichens of *Umbilicaria* species. Chem. Pharm. Bull., 18 (7): 1431-1434

Northcote, D. H., Goulding, K. J. y Horne, R. W. (1958). The chemical composition and the structure of the cell wall of *Clathrorella pyrenoidosa*. Biochem. J., 70: 391-397

Palmqvist, K., Samuelsson, G. y Badger, M. R. (1994). Photobiont-related differences in carbon acquisition among gree-algal lichens. Planta, 195: 70-79

Percival, E. y McDowel, R. H. (1981). Algal Walls. En Tanner and Loewus (Eds.) Encyclopedia of Plant Physiology, Plant Carbohidrates II: 277-306. Springer-Verlag

Ray, P. M., Green, P. B. y Cleland, R. (1972). Role of turgor in plant cell growth. *Nature*, 239: 163-164

Rikkinen, J. (1997). Habitat shift and morphological variation of *Pseudevernia furfuracea* along a topographical gradient. *Acta Univ. Ups. Symb. Bot. Ups.* 32 (1): 223-245

Sancho, L. G. y Kappen, L. (1989). Photosynthesis and water relations and the role of anatomy in Umbilicariaceae (lichens) from Central Spain. *Oecologia*, 81: 473-480

Scott, M. G. y Larson, D. W. (1986). The effect of winter field conditions on the distribution of two species of *Umbilicaria*. III. CO₂ Exchange in thalli exposed to laboratory simulations of winter. *New Phytol.*, 102: 327-343

Sentandreu, R., Herrero, E. y Elorza, M. V. (1984). The assembly of wall polymers in yeast. En C. Nombela (Ed.) *Microbial cell wall synthesis and autolysis*: 51-61. Elsevier, Amsterdam

Sietsma, J. H. y Wessels, J. G. H. (1979a). Wall structure and growth in *Schizophyllum commune*. Vol. 2. En J. H. Burnett y A. P. J. Trincly (Eds.) *Fungal walls and hyphal growth*: 27. British Mycological Society Symposium. Cambridge University Press, Cambridge

Sietsma, J. H. y Wessels, J. G. H. (1979b). Evidence for covalent linkages between chitin and β -glucan in fungal wall. *J. Gen. Microbiol.*, 114: 99-108

Strobl, A., Türk, R. y Thalhamer, J. (1994). Investigations on the protein composition of the lichen *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopt var. *Ceratea* (ACH.) Hawsksw. from different altitudes. *Phyton*, 34 (1): 67-83

Sundberg, B., Palmqvist, K., Essen, P-A. y Renhorn, K-E. (1997). Growth and vitality of epiphytic lichens. II. Modelling of carbon gain using field and laboratory data. *Oecologia*, 109: 10-18

Takabashi, K., Tatsushiko, K., Yokota, I y Shibata, S. (1981). Chemotaxonomic studies on the polysaccharides of lichens. Polysaccharides of stereocaulaceus lichens. *Carbohydrate Research*, 89: 166-173

Takahashi, K., Kon, T., Yokota, I y Shibata, S. Chemotaxonomic studies on the polysaccharides of lichens. Polysaccharides of stereocaulaceous lichens. *Carbohydrate Research*. 89: 166-

Takahashi, K., Takeda, T. y Shibata, S. (1979). Polysaccharides of lichen symbionts. *Chem. Pharm. Bull.*, 27 (1): 238-241

Takeda, T., Funatsu, M., Shibata, S. y Fukuoka, F. (1972). Polysaccharides of Lichens and Fungi. V. Antitumor active polysaccharides of lichens of *Evernia*, *Acrosyphus* and *Alectoria* spp. *Chem. Pharm. Bull.*, 20 (11): 2445-2449

Takeda, T., Nishikawa, Y. y Shibata, S. (1970). A new α -Glucan from the lichen *Parmelia caperata* (L.) Acu. *Chem. Pharm. Bull.*, 18 (5): 1074-1075

Tehler, A. (1990). A new approach to the phylogeny of Euascomycetes with a cladistic outline of Arthoniales focussing on Rocellaceae. *Canadian Journal of Botany*. 68: 2458-2492

Teixeira, A. Z. A., Iacomini, M. y Gorin, P. A. J. (1995). Chemotypes of manose-containing polysaccharides of lichen mycobionts: a possible aid in classification and identification. *Carbohydrate Research*, 266: 309-314

Teixeira, A.Z.A., Iacomini, M., McCune, B. y Gorin, P.A.J. Heteropolysaccharides of the lichen *Evernia prunastri*. Carbohydrate Research. 264: 63-71

Ulanders, A. y Tollens, B. (1906). Untersuchungen über die Kohlenhydrate der Flechten. Chem. Ver. 39: 401

Woranowicz, S. M., Gorin, P. A. J., Marchelli, M. P., Torris, G. y Iacomini, M. (1997). Structural studies on the Galactomannans of lichens of the Genus *Cladonia*. Lichenologist, 29 (5): 471-481

Yokota, I., Shibata, S. y Saitô, H. (1979). A ^{13}C -n.m.r. analysis of linkages in lichen polysaccharides: an approach to chemical taxonomy of lichens. Carbohydrate Research, 69: 252-258

